



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias
Dpto. Biología Molecular y Bioquímica

Tesis Doctoral
Programa de doctorado en Biología Celular y
Molecular

Interacciones funcionales y estructurales de
las poliaminas con otras aminas biógenas y
membranas biológicas

Carlos Acosta Andrade

Directores:

Ignacio Fajardo Paredes

José Luis Urdiales Ruiz

Málaga, 2017


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Carlos Acosta Andrade

 <http://orcid.org/0000-0002-8192-3514>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias
Dpto. Biología Molecular y Bioquímica

MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES, Director del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

ACREDITA QUE la Tesis Doctoral titulada "INTERACCIONES FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE LAS POLIAMINAS CON OTRAS AMINAS BIÓGENAS Y MEMBRANAS BIOLÓGICAS", que presenta D. Carlos Acosta Andrade para optar al título de Doctor en Ciencias, ha sido realizada bajo la dirección de los doctores D. Ignacio José Fajardo Paredes y D. José Luis Urdiales Ruiz, ambos Profesores Titulares de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Málaga a 28 de noviembre de 2016.

Fdo. Miguel Ángel Medina Torres



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias
Dpto. Biología Molecular y Bioquímica

IGNACIO JOSÉ FAJARDO PAREDES, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y

JOSÉ LUIS URDIALES RUIZ, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN que D. CARLOS ACOSTA ANDRADE, Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos recogidos en la presente Memoria para optar al título de Doctor en Ciencias por la Universidad de Málaga. Así mismo, el profesor Ignacio José Fajardo Paredes ha sido el tutor del doctorando durante toda su etapa predoctoral. El doctorando ha llevado a cabo la mayor parte de los experimentos aquí recogidos en las instalaciones del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga. No obstante, algunos experimentos los ha realizado en el laboratorio del Dr. Félix Goñi (Universidad del País Vasco, Bilbao) y en el del Dr. Bernard Gibbs (Universidad de Kent, UK). Finalmente, los experimentos consignados en el capítulo I de la presente Memoria requirieron autorización del Comité de Ética de la UMA-CEUMA. Se adjunta copia de la correspondiente autorización, con número de referencia 2012-0059-A

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente en Málaga a 28 de noviembre de 2016.

Fdo.: Ignacio Fajardo Paredes

Fdo.: José Luis Urdiales Ruiz



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido subvencionado por los proyectos SAF2011-26518 y BFU2015-66306-P del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), y el proyecto PAIDI P10-CVI6585 y Bio-267 (Junta de Andalucía). Se agradece el apoyo del CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) del Instituto de Salud Carlos III, así como el de la Universidad de Málaga y el proyecto Andalucía-Tech. Parte de los resultados y metodologías recogidas en la presente Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

- Carlos Acosta-Andrade, Ana Lambertos, José Luis Urdiales, Francisca Sánchez-Jiménez, Rafael Peñafiel, Ignacio Fajardo (2016) *A novel role for antizyme inhibitor 2 as a regulator of serotonin and histamine biosynthesis and content in mouse mast cells. Amino Acids*, 48: 2411-2421. PMID: 27084713 DOI: 10.1007/s00726-016-2230-3
- Carlos Acosta-Andrade, Ibai Artetxe, Marta G. Lete, Kepa Ruiz-Mirazo, Felix Goñi, Francisca Sánchez-Jiménez (2017) *Polyamine-RNA-membrane interactions: from the past to the future of biology. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155: 173–181. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.005
- Carlos Acosta-Andrade, José L. Urdiales, Ignacio Fajardo, Francisca Sánchez-Jiménez. *Evaluation of Histidine decarboxylase activity and Human Histamine Receptor 3 (H3R) and Histidine Decarboxylase (HDC) mRNA Levels*. En "Histamine Receptors as Drug Targets". Springer (2017). ISBN: 978-1-4939-6841-1.
- Carlos Acosta-Andrade, Ana Lambertos, José Luis Urdiales, Francisca Sánchez-Jiménez, Rafael Peñafiel, Ignacio Fajardo. *A role for Antizyme Inhibitor 2 in the biosynthesis and content of histamine and serotonin in mouse mast cells*. 44th Annual Meeting of the European Histamine Research Society, Torremolinos (2015). Póster. Ponente: Carlos Acosta-Andrade.
- Carlos Acosta-Andrade, Ana Lambertos, José Luis Urdiales, Francisca Sánchez-Jiménez, Rafael Peñafiel, Ignacio Fajardo. *A role for Antizyme Inhibitor 2 in the biosynthesis and content of histamine and serotonin in mouse mast cells*. 14th

International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (ICAAP), Viena (2015). Comunicación Oral. Ponente: Ignacio Fajardo.

- Carlos Acosta-Andrade, Ana Lambertos, José Luis Urdiales, Francisca Sánchez-Jiménez, Rafael Peñafiel, Ignacio Fajardo. *A role for Antizyme Inhibitor 2 in the biosynthesis and content of histamine and serotonin in mouse mast cells*. XXXVIII Congreso de la SEBBM - Valencia (2015). Póster. Ponente: Carlos Acosta-Andrade.
- Carlos Acosta-Andrade, José Luis Urdiales, Ignacio Fajardo, Francisca Sánchez-Jiménez. *Evaluation of histidine decarboxylase (HDC) activity and human histamine receptor (H3R) mRNA levels*. 45th Annual Meeting of the European Histamine Research Society, Florence (2016). Póster. Ponente: Carlos Acosta-Andrade.
- Carlos Acosta-Andrade, Ibai Artetxe, Marta G. Lete, Kepa Ruiz-Mirazo, Felix Goñi, Francisca Sánchez-Jiménez. *Polyamine-RNA-membrane interactions: from the past to the future of biology*. XXXIX Congreso de la SEBBM - Salamanca (2016). Póster. Ponente: Carlos Acosta-Andrade.



Nº: 117

Nº EXP. CEUMA: 2012-0059-A

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Reunido el Comité Ético de Experimentación en pleno, el día 5 de marzo de 2013 ha evaluado la solicitud del procedimiento denominado: "Obtención de células de la Médula Ósea", cuyo investigador principal es D. Ignacio Fajardo Paredes, solicitado en la fecha 08/11/2012.

Una vez examinada la documentación presentada ha verificado aquellos aspectos relacionados con la ética y la legislación en materia de investigación con animales:

- REAL DECRETO 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- LEY 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- DECRETO 142/2002, de 7 de mayo, por el que cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación y otros fines científicos.(BOJA nº. 55)
- El organismo propuesto es el mejor modelo biológico o si existen alternativas fiables y contrastadas a su uso, especialmente en el caso de animales de experimentación, de cara a la consecución de los objetivos marcados.
- La idoneidad del procedimiento experimental, especialmente la posibilidad de alcanzar conclusiones válidas de acuerdo con los objetivos establecidos, obligando al empleo del menor número posible de éstos.
- El mantenimiento de los animales se realiza en un centro autorizado y bajo las condiciones que aseguran su bienestar.
- Los métodos y las prácticas utilizadas conceden un trato que evite el dolor, el sufrimiento o la lesión, prolongados innecesariamente. Los métodos de anestesia/analgesia utilizados para con los animales, adecuados para que no sufran innecesariamente y para eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia.
- El uso de métodos eutanásicos adecuados a la especie animal y al procedimiento que se realice.

Decide por consenso emitir Informe Ético **FAVORABLE**

Para que así conste, Dña. MARÍA VALPUESTA FERNÁNDEZ, Vicerrectora de Investigación y Transferencia y Presidenta del Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga firma el presente informe, en Málaga a cinco de marzo de dos mil trece.








UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IGNACIO JOSÉ FAJARDO PAREDES, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y

JOSÉ LUIS URDIALES RUIZ, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

AUTORIZAN a D. CARLOS ACOSTA ANDRADE a la lectura y defensa de esta memoria de Tesis Doctoral.

Así mismo, los co-directores de la Tesis certifican que todas las publicaciones (y comunicaciones a congresos) que avalan la presente memoria de Tesis Doctoral no han sido utilizadas en tesis anteriores, y han sido generadas , parcial o totalmente, a partir de resultados y metodologías desarrollados durante la realización de la Tesis Doctoral de D. Carlos Acosta Andrade.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente en Málaga a 28 de noviembre de 2016.

Fdo.: Ignacio Fajardo Paredes

Fdo.: José Luis Urdiales Ruiz



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer todo su esfuerzo y empeño al Dr. Ignacio Fajardo, puesto que desde mi Trabajo Fin de Máster hasta la consecución de la presente Tesis Doctoral ha sido mi mentor, además de Tutor y Director de ambos trabajos. Muchísimas gracias por tu dedicación, por esas interminables horas midiendo actividad HDC y ODC, por su paciencia a la hora de explicarme la difícil vida de los mastocitos y su diferenciación (y las tardes infinitas para su extracción!). Por todo lo que me ha aportado a mi vida científica y personal, por ser un amigo, y por hacer de aquel licenciado hoy un investigador gracias a su excelente formación y su constancia. Por todo ello, mil gracias.

En segundo lugar, al Dr. José Luis Urdiales. Por su infinita paciencia, por estar siempre dispuesto a echar una mano, por colaborar más allá de lo increíble en el éxito de las qRT-PCRs, por explicarme, apoyarme y buscar siempre una solución a todos los problemas y por hacer que todo funcione bien en el laboratorio. Por ser un mentor siempre con una buena idea en la que no habías pensado, por todo lo que me ha enseñado y he aprendido gracias a él, mi más sincero agradecimiento.

En tercer lugar, a la Dra. Francisca Sánchez-Jiménez, Kika, pasando tras esta tesis a formar parte de los “niños de Kika”. Ella me dio mi primera oportunidad en el mundo científico, ella siempre con ímpetu, optimismo, trabajo y tesón, con una pasión desmedida por la ciencia y el saber, con preguntas certeras que nadie más se atreve a realizar, siempre cariñosa y sacando cualquier momento de su apretada agenda para escucharte. Ella, que nos ha ayudado a tantos científicos a formarnos en este campo tan duro como profesión, y a no perder la fe en lo que está por venir, siempre que trabajas al máximo. Por todos los congresos que hemos compartido, y donde ha recibido numerosas muestras de cariño como científica y persona, mi abrazo más sentido y mi agradecimiento por siempre.

A los compañeros de laboratorio. Primeramente a Mariavi y Javi, que me han hecho sentir que el laboratorio era mi hogar, y que había que cuidarlo y respetarlo. Por sus consejos, su compañía y su inestimable ayuda, gracias. A Alejandro, por compartir quebraderos de cabeza por culpa de las poliaminas, por las risas y los buenos ratos cada mañana y por su compañía en algunos lunes duros. A los chicos del SCAI, Casimiro, Auxi, Paloma, Mari y José Joaquín, por hacerme sentir como en casa cuando los iba a visitar a su laboratorio, y siempre dispuestos a colaborar, así como interrumpir mis horas de soledad en bioquímica para pedir algún reactivo y, de paso, un café. Gracias a todos vosotros, pues habéis ayudado a la realización de esta tesis.

Al grupo de investigación de Bilbao, en primer lugar, al Dr. Felix Goñi. Por su saber, su paciencia, sus consejos y su cariño, inestimable cocinero y biofísico, por acogerme en su laboratorio para enseñarme qué es un liposoma, como hacerlos y como pueden utilizarse para hacer trabajos realmente bonitos. Por todo lo que me ayudó en mi estancia allí, por hacerme enamorarme de la ciudad de Bilbao y las buenas charlas mantenidas cuando nos hemos encontrado, mil gracias. A los chicos de Biofísica, al novelísimo Dr. Artetxe, Ibai, compañero de fatigas, gran investigador y amigo, un “crack” con todas las letras, por su ayuda con los experimentos y sus ideas, su constancia, y mil momentos compartidos en esta aventura en busca de los orígenes de la vida. A la Dra. Marta, por sus ideas, su trabajo, su guía constante, su sentido del humor y su pragmatismo, intentando que ni Ibai ni yo nos fuésemos por las ramas en el sentido experimental. A Emilio, un investigador como la copa de un pino, paisano almeriense, al Dr. Javi, ciclista, de Portugalete, un grande dentro y fuera del laboratorio, a Zuriñe por sus ironías y su carácter, a Araceli por su magnífica labor para que todos nos comportásemos, o uniéndose al buen rollo del grupo. Al grandísimo Txus, el hombre para todo, chicarrón del norte, siempre amable, el mayor elogio es que yo de mayor quiero ser como Txus. A Marina, a Bingen (muchísimas gracias por los experimentos del magnesio!), a Montse y Ornella, a la Dra. Alicia Alonso y al Dr. Kepa Mirazo (el origen de la vida cobra sentido cuando habla) y a todos los que conforman el extraordinario grupo que es la unidad de Biofísica. Muchísimas gracias por hacerme tener en Leioa una segunda casa. Eskerrik asko!

Al Dr. Bernhard Gibbs, de la Universidad de Kent, por acogerme para la realización de mi estancia internacional, por sus conocimientos sobre basófilos y mastocitos, pero sobre todo por haberme guiado en los experimentos, con paciencia y buen humor, por todos los largos días purificando basófilos y explicaciones sobre los mismos. Por enseñarme a ampliar miras, a que el mundo no es solo poliaminas, sino que la diversificación del conocimiento puede llevarte a avanzar en campos que ni habías imaginado. Por permitirme descubrir Canterbury, Chatham y la región de Kent, y por una estancia difícil de olvidar. Thank you very much.

A mi familia, a todos ellos, a mi hermano Dani, mi cuñada y mi sobrino Guille. A mis padres, que siempre me han apoyado, que siempre están ahí para lo bueno y lo malo, que han apostado por mí en el camino que he elegido, y de los que me siento especialmente orgulloso. Porque son un ejemplo de educación y constancia, de lo que unos padres deben de ser, y porque sin ellos yo no estaría hoy escribiendo estas líneas. Porque lo son todo para mí, y los quiero inmensamente. Muchísimas gracias. También a mi familia adoptiva, mis queridísimos Pepe, Rosa y Aitana, y Laura e Isra, y el resto de la familia que me ha acogido como parte suya, con los que he compartido este camino de tesis y se han alegrado y me han apoyado en cada uno de los pasos que he dado. Os quiero muchísimo. A mis mejores amigos Javi y Lucía, y a Fran, Julios (los dos) y Leo, a José, Yago y Mateo, y a muchos amigos más, gracias por apoyarme y permitirme desconectar de la ciencia de tanto en tanto.

Por último, a la Dra. Silvia García Mayor, el amor de mi vida. Casualmente nos conocimos el día que presenté mi Trabajo Fin de Máster, y en todo ese tiempo hasta el momento presente me has acompañado en este trayecto para mi tesis que, sin ti, no hubiera sido posible. Compañera y amiga, la persona que más admiro del mundo, trabajadora, luchadora, cariñosa, eres la mejor, sin duda alguna. Has estado conmigo en los momentos buenos y malos, en todos y cada uno de esos días después del laboratorio (mención especial a mi pequeño gato Ronnie, que se acurrucaba al llegar), me has escuchado y apoyado, por lo que esta tesis también te corresponde a ti. No puedo describir con palabras lo que siento, pero creo que no hace falta. Porque, como diría Jack Nicholson en Mejor Imposible, “haces que quiera ser mejor persona”. Y científico también. Te quiero, Silvia, Come What May.

"Aquellos que se enamoran sólo de la práctica, sin cuidar de la exactitud o de la ciencia, son como el piloto que se embarca sin tomín ni aguja, y nunca sabrá dónde va a parar"

Leonardo da Vinci



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice

Resumen	3
Summary	13
Introducción general	23
1. Las poliaminas: unas moléculas esenciales para la vida.....	25
1.1. Introducción	25
1.2. Metabolismo de las poliaminas.....	26
1.3. Regulación de los niveles intracelulares de poliaminas.	30
2. Aminoácidos biogénicos. Histamina y serotonina.....	33
2.1. Histamina. Introducción, metabolismo y funciones fisiológicas	33
2.2. Serotonina. Introducción, metabolismo y funciones fisiológicas.....	36
2.3. Interacciones de los aminoácidos biogénicos con las poliaminas.....	38
3. Mastocitos y basófilos.	40
3.1. Biología general del mastocito	40
3.2. Gránulos de los mastocitos y el papel de las poliaminas.	40
3.3 Modelos celulares para el estudio de mastocitos	42
3.4. Basófilos humanos	43
3.5. Interrelación de aminoácidos biogénicos y poliaminas en mastocitos y basófilos	44
4. Membranas celulares	46
4.1. Aspectos biológicos y biofísicos.....	46
4.2 Poliaminas en el mundo prebiótico.....	47
4.3. Interacciones de las membranas biológicas con las poliaminas.....	48
4.4. Interacciones entre ácidos nucleicos y poliaminas	49
4.5. Liposomas, poliaminas y ácidos nucleicos: un tripartito inédito	49
Hipótesis y objetivos.....	51
Hypothesis and aims.....	55
Material y Métodos	59
1. Material y productos empleados	61
2. Cultivos celulares y métodos de biología celular	61
2.2. Células WEHI-3B	62
3. Métodos bioquímicos y de biología molecular	64
5. Análisis estadístico	78
Resultados y discusión, Capítulo I: Un nuevo papel para el inhibidor de antizima 2 como regulador de la biosíntesis y los niveles de histamina y serotonina en mastocitos de ratón*	81
Resultados y discusión, Capítulo II: Papel de SSAT en la regulación de los aminoácidos biogénicos en basófilos y mastocitos humanos*	99
Resultados y discusión, Capítulo III: Interacciones poliaminas-membranas-ARN: del pasado al futuro de la biología*	113
Consideraciones finales	131
Conclusiones	137
Conclusions	141

Referencias.....	145
ANEXOS.....	165
ANEXO I: Evaluation of Histidine Decarboxylase (HDC) Activity and Human Histamine Receptor 3 (H3R) and HDC mRNA Levels
ANEXO II: A novel role for antizyme inhibitor 2 as a regulator of serotonin and histamine biosynthesis and content in mouse mast cells
ANEXO III: Polyamine-RNA-membrane interactions: from the past to the future of biology

Lista de abreviaturas

1,8 DO	1,8-diaminooctano
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
ADC	Arginina descarboxilasa
AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1, -2	Proteína activadora -1, -2
AZ	Antizima
AZIN	Antizima inhibidor
BLM	Membranas de lípidos “black” o negros
BMMCs	Mastocitos derivados de médula ósea
BSA	Albúmina sérica bovina
CB	Sangre umbilical
CL	Cardiolipina
CPA	Carboxipeptidasa A
CREB	Elemento de respuesta a cAMP
CTMC	Mastocitos del tejido conectivo
DDSA	Anhídrido dodecínil succínico
DENSpm	N1-N11-dietilnorespermina
DFMO	Difluorometilornitina
DPBS	Tampón salino fosfato Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
EATC	Células de tumor ascítico de Ehrlich
ECL	Células de tipo enterocromafín
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FACS	Separación celular activada por fluorescencia
FBS	Suero fetal bovino
FcεRI	Receptor de alta afinidad para IgE
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GADPH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GMP	Precursor granulo-monocítico
GUV	Vesículas unilaminares gigantes
H1-4R	Receptor de histamina (1-4)
HDAC7	Histona desacetilasa
HDC	Histidina descarboxilasa
Hia	Histamina
HIF1α	Factor de respuesta a hipoxia 1α
HMC-1	Línea de mastocitos humana 1
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleuquina
KLF-4	Factor 4 de tipo Kruppel
LUCA	Último antecesor común universal
LUV	Vesículas unilaminares grandes
MAT	5-metiladenosina
MC	Mastocitos
MCT	Mastocitos triptasa positivos
MCTC	Mastocitos triptasa y quimasa positivos
MITF	Factor de transcripción asociado a microftalmia
MLV	Vesículas multilaminares
MMC	Mastocitos de la mucosa
mMCP	Proteasa de mastocitos de ratón
NF-E2	Factor nuclear E2
NOS2	Óxido nítrico sintasa 2
Nrf-2	Factor nuclear de eritrocitos 2

OA	Ácido oleico
ODC	Ornitina descarboxilasa
PA	Poliaminas
PAO	Poliamina oxidasa
PB	Sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PDI	Índice de polidispersión
PE	Fosfatidiletanolamina
PEST	Regiones ricas en prolina, glutamato, aspartato, serina y treonina
PG	Proteoglicanos
PI	Fosfatidilinositol
PIP	Fosfatidilinositol fosfato
PIP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PMF-1	Proteína factor modulador de poliaminas 1
PTFE	Politetrafluoroetileno
Put	Putrescina
Resv	Resveratrol
Rh	Radio hidrodinámico
Rho-PE	Fosfatidiletanolamina asociada a rodamina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAM	S-Adenosilmetionina
SAMDC	S-Adenosilmetionina descarboxilasa
SCF	<i>Stem cell factor</i> (factor de células madre)
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar
SMO	Espermina oxidasa
SNC	Sistema nervioso central
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
SSAT	Espermidina/espermina N1-acetiltransferasa
SUMI	Moléculas e Iones Universales pequeños
SUV	Vesículas unilaminares pequeñas
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tip60	Histona acetiltransferasa
TPH	Triptófano hidroxilasa
TSLP	Linfopoyetina tímica estromal
β-Gal	β-Galactosidasa

Resumen



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La poliaminas (PA) derivadas de la ornitina, esto es, putrescina (Put) espermidina (Spd) y espermina (Spm), son policationes alifáticas que se encuentran presentes en prácticamente todos los seres vivos (Cohen, 1998). Las PA son esenciales para el crecimiento y proliferación en células eucariotas, siendo clave su metabolismo, que consiste en una serie de acciones concertadas entre diversas enzimas y transportadores que llevan a cabo la biosíntesis, catabolismo, transporte y/o eliminación de un amplio rango de metabolitos, todo ello para asegurar la homeostasis de los niveles de PA intracelulares (Miller-Fleming y cols., 2015). Entre las enzimas más importantes del metabolismo de PA, la ornitina descarboxilasa (ODC) es generalmente aceptada como la enzima clave de su biosíntesis. La ODC lleva a cabo el primer paso, esto es, la descarboxilación de la ornitina para formar Put. A partir de la obtención de Put, se sucede la adición a esta diamina de grupos aminopropilo por la espermidina sintasa y espermina sintasa, dando lugar a la síntesis de Spd y Spm, respectivamente. En ambos casos, el aporte de grupos aminopropilo procede de la S-adenosilmetionina descarboxilada.

Una mala regulación de los niveles de PA puede ser letal para la viabilidad celular, ya no sólo por defecto, sino también por exceso, pues se ha descrito que altos niveles de PA pueden inducir apoptosis celular (Poulin y cols., 1995a). Por eso, los niveles de PA están finamente regulados a través de su síntesis, degradación y transporte. Esta regulación ha de ser muy estricta y en diferentes puntos de su metabolismo, a fin de evitar los posibles efectos deletéreos debidos a variaciones en los niveles de PA. Uno de los puntos de regulación más importantes de los niveles de ODC y, por tanto, de PA, es el sistema ODC-antizima-inhibidor de antizima. La estabilidad y actividad de ODC viene regulada por los niveles de PA de manera indirecta, a través de un mecanismo de acción en el que intervienen unas proteínas denominadas antizimas (AZ). En mamíferos, la familia de AZ presenta tres isoformas, llamadas AZ1, AZ2 y AZ3. En general, AZ es una proteína inhibidora específica de ODC que afecta a su tasa de recambio, siendo capaz de unirse a los monómeros de ODC y llevarlos a degradación mediante el proteasoma 26S de forma independiente de ubiquitinación (Hayashi y cols. 1996; Coffino, 2001). Cabe destacar también que AZ es capaz de inhibir la incorporación de PA mediante transporte por un mecanismo aún no caracterizado. Los niveles de PA tienen un efecto importante en la propia regulación de AZ, dado que altos niveles de PA estimulan su síntesis e inhiben su degradación (Mangold, 2005, 2006).

Asimismo, AZ posee sus propias proteínas inhibidoras, tal y como le ocurre a ODC. Éstas son denominadas inhibidores de antizima (AZIN) y esta familia consta de dos isoformas (AZIN1 y AZIN2). Ambas poseen una alta homología con ODC, pero sin actividad descarboxilasa. Son capaces de unirse a las tres isoformas de AZ, y tienen en particular que la unión AZIN-AZ posee mayor afinidad que la unión ODC-AZ (Fujita, 1982). De esta manera, las proteínas AZIN son muy efectivas impidiendo las acciones inhibidoras de AZ tanto sobre ODC (promoviendo por tanto su liberación para la formación de homodímeros funcionales) como sobre el transporte de PA (López-Contreras y cols., 2010). En cuanto a distribución de AZIN, AZIN1 es casi ubicuo, expresándose en muchísimos tejidos entre los que se destacan hígado, corazón y, en menor medida, riñones (Murakami y cols., 1996; Mangold, 2006), mientras que AZIN2, en contraste, se expresa de manera mucho más restringida. Algunos de los tejidos donde se expresa AZIN2 son el testículo, cerebro, glándulas adrenales y páncreas (López-García y cols. 2013). Curiosamente, AZIN2 también se expresa en algunos tipos celulares específicos, como los mastocitos; en 2009 se describió la presencia de AZIN2 asociada a los gránulos de los mismos (Kanerva y cols. 2009).

Las PA son capaces de interrelacionarse con otras aminas biógenas, como son la histamina (Hia) y la serotonina (5-HT). Al contrario que las PA, Hia y 5-HT son aminas biógenas presentes únicamente en un número limitado de tipos celulares, incluyendo algunas

células del sistema inmune y neuronas. Sin embargo, tanto las PA como la Hia muestran un esqueleto común de 1,4-diamina, y comparten algunas similitudes en sus vías metabólicas: (i) su biosíntesis proviene del metabolismo de aminoácidos catiónicos; (ii) el primer paso de la biosíntesis es una descarboxilación dependiente de piridoxal-5'-fosfato (PLP); (iii) su catabolismo podría involucrar la acción de oxidasas comunes; (iv) S-adenosilmetionina (SAM) proporciona los grupos aminopropilo y metilo en la biosíntesis de PA y en el catabolismo de la Hia, respectivamente; y (v) ambos tipos de aminas pueden unirse covalentemente a proteínas mediante la acción de las transglutaminasas (Medina y cols., 2003; Sánchez-Jiménez y cols., 2007). Todas estas evidencias hacen suponer la existencia de interferencias mutuas entre sus metabolismos. Por otro lado, la 5-HT está presente en mastocitos de ratón y humanos (Meuer y cols., 1981; Suteret y cols., 2007; Papaliodis y cols., 2008). Debido a las numerosas evidencias de la importancia de las PA y la Hia en la fisiología de los gránulos de los mastocitos (García-Faroldi, 2009a, 2010), no es descabellado pensar que la 5-HT tenga también algún papel relevante en los mismos. Dada la relativamente reciente descripción de la posible existencia de diferentes subtipos de gránulos en mastocitos (Puri y Roche, 2008), AZIN2 fue asociado a un subtipo que contenía 5-HT y catepsina D como principales marcadores. En manera resumida, se postuló que AZIN2 podría actuar como un regulador local de la biosíntesis de PA asociado a estos gránulos con contenido en 5-HT (Kanerva y cols. 2009). Por lo descrito con anterioridad, parece que existe una interrelación entre el metabolismo de las PA y el de Hia y 5-HT, si bien aún no está bien caracterizada. Es muy posible que estas interacciones dependan del tejido y/o tipo celular del que se trate y del ambiente y los estímulos a que estén sometidos.

Paralelamente, las PA son capaces de interactuar no sólo con las aminas biógenas sino también en el conjunto de las estructuras dependientes de membrana. Un buen ejemplo de esto sería el sistema de transporte e incorporación de las PA. Si bien los niveles de PA intracelulares dependen de las vías de síntesis y degradación, los mecanismos de transporte también juegan un papel muy importante. En este sentido, se ha venido investigando durante décadas para identificar el transportador de las PA, siendo a día de hoy una de las incógnitas más importantes en este campo. Sin embargo, numerosos estudios han caracterizado las propiedades bioquímicas y moleculares que debería de tener dicho transportador, e incluso en los últimos años se han descrito algunos posibles modelos para el transportador de PA (Poulin y cols., 2012). Aunque la regulación de la actividad de la ODC se describirá ampliamente en el apartado 1.3 de la introducción, aquí cabe destacar numerosos estudios que han demostrado que bajos niveles de PA y/o altos niveles de AZ conllevan un aumento de la incorporación de PA exógenas (Kahana, 2009; Ramos-Molina y cols., 2015). Además, se ha descrito que las PA tienen la capacidad de unirse a proteínas de transporte de membrana (Dela y Delcour, 1996; Yamaguchi y cols., 2006).

Desde finales del siglo pasado, se han realizado pocos estudios que relacionen las vesículas lipídicas y las PA. En esta línea, se han descrito interacciones con vesículas formadas principalmente de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidil colina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol, usando un amplio rango de condiciones experimentales (Schubert y cols., 1983; Tadolini y Varani, 1986; Cohen, 1998). Recientemente, se han descrito importantes avances en las interacciones biofísicas entre las PA y las vesículas lipídicas (Finger y cols., 2014). Sin embargo, estas interacciones y su importancia funcional configuran aún un área oscura de la biología celular y molecular, especialmente en animales donde el transportador específico de PA aún no ha sido descrito (Abdulhussein y Wallace, 2014). De manera más práctica, el avance en la caracterización de estas interacciones moleculares descritas previamente puede suponer un impulso para numerosos campos de investigación científicos y biotecnológicos; por ejemplo, en la regulación inflamatoria o neuroendocrina (Kanerva y cols., 2009), mecanismos de señalización modulados por PA (Coburn, 2009), incluyendo aquellos relacionados con la progresión del cáncer (Gilmour, 2007; Ruiz-Pérez y cols., 2015), así como el desarrollo de terapias basadas en PA (Chen y cols., 2006). Por todo lo descrito en este

apartado, existen evidencias de que las PA y sus elementos relacionados juegan un papel importante como moduladores de la estructura y/o dinámica de membranas.

Por otra parte, las PA son capaces también de interactuar con los ácidos nucleicos y proteínas, al tratarse éstos de macromoléculas polianiónicas. Las PA ejercen sus funciones como reguladores de la expresión génica por sus interacciones con proteínas, así como su habilidad para estabilizar y remodelar la estructura de la cromatina (Childs y cols., 2003). Asimismo, son capaces también de modular la tasa de transcripción (Thomas y cols., 1995) y la unión de proteínas al ADN (Panagiotidis y cols., 1995), y de unirse y producir cambios estructurales en el ARN (Igarashi y Kashiwagi, 2010). Además, cabe destacar que la Spd es también un precursor de la hipusina, un activador covalente del factor eIF-5A (Kaiser, 2012). En los últimos 20 años se han realizado múltiples trabajos biofísicos para determinar las conformaciones más probables de la Spd y Spm a la hora de interactuar con el ADN genómico y otros fragmentos de ADN de diferentes longitudes y secuencias (Basu y cols., 1996; Cohen, 1998; Ruiz-Chica y cols., 2001 y 2003). De manera resumida, podemos afirmar que las PA son capaces de estabilizar la doble hebra de ADN, siendo capaces de inducir transiciones de conformación B a Z, e incluso formando fases colestéricas en aquellas secuencias enriquecidas en GC (Ruiz-Chica y cols., 2001). Recientemente, se ha publicado una interesante revisión de los estudios biofísicos realizados acerca de las interacciones entre las PA y el ARN, así como sus consecuencias funcionales más directas (Lighfoot y Hall, 2014).

Un modelo de estudio interesante para determinar las interacciones de las PA con otros elementos, como son las aminos biógenas y/o las membranas, sería el mastocito. En este tipo celular, la característica más importante y distintiva son sus gránulos secretores, que contienen una amplia variedad de moléculas conocidas en general como "mediadores". Una vez que los mastocitos son activados para la desgranulación, éstos llevan a cabo la práctica totalidad de sus funciones a partir de la liberación al medio extracelular de estos compuestos, siendo por tanto los efectores de eventos fisiológicos y fisiopatológicos asociados a estas células (Wernersson y Pejler, 2014). En humanos, los mastocitos están ampliamente distribuidos en varios órganos y tejidos, siendo particularmente abundantes en sitios de interacción con el medio externo, como la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal. Sin embargo, éstos apenas conforman el 1% del total respecto a otras células inmunes (Cardamone y cols., 2016). Asimismo, debido a que los mastocitos se encuentran diferenciados en los tejidos, es muy difícil aislarlos de los organismos de origen y obtener importantes cantidades de los mismos. En los últimos años se ha producido un aumento en el número de trabajos científicos que, en lugar de líneas celulares, utilizan mastocitos derivados de la médula ósea de ratón (*bone-marrow derived mast cells*, BMMCs) (Malbec y cols., 2007). Estos BMMCs han sido considerados por muchos autores como el equivalente más próximo a mastocitos tipo mucosa o MMC de ratón. Los BMMCs expresan FcεRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y liberan los mediadores almacenados en los gránulos mediante estimulación con inmunoglobulina E (IgE), siendo ampliamente utilizados para estudiar el proceso de desgranulación (Benhamou y cols., 1990; García-Faroldi y cols., 2009b). Asimismo, estos estudios han permitido analizar una enorme variedad de componentes presentes en los gránulos, así como las funciones que éstos ejercen (Wernersson y Pejler, 2014). Nuestro grupo de investigación ha trabajado durante los últimos años con BMMCs. En este tipo celular se ha demostrado que las PA afectan a la síntesis de Hia durante las etapas tempranas de diferenciación de los BMMCs utilizando interleucina 3 (IL-3, García-Faroldi y cols., 2009a). Asimismo, se observó que las PA están presentes en los gránulos secretores de mastocitos, siendo importantes para el almacenamiento de Hia y los niveles de 5-HT (García-Faroldi y cols., 2010).

Como ya se mencionó anteriormente, se ha descrito que AZIN2 está presente en gránulos de mastocitos de ratón, asociado al subtipo de granulos que contiene 5-HT, y postulándose como un regulador local de la biosíntesis de PA (Puri y Roche, 2008; Kanerva y cols., 2009). En los últimos años, el grupo de investigación del Dr. Rafael Peñafiel (Universidad de Murcia) ha realizado importantes progresos en el papel de AZIN2 trabajando

con un modelo de ratón transgénico hipomórfico para el gen *Azin2* (Lopez-García y cols., 2013). De manera resumida, estos ratones poseen una versión truncada del gen *Azin2* fusionado con el gen bacteriano *lacZ* (codificante para β -D-galactosidasa) bajo el control del promotor natural de *Azin2*. De esta forma, en lugar del producto génico correspondiente a *Azin2*, estos animales expresan una proteína recombinante que consiste en una versión truncada inactiva de AZIN2 (contiene los primeros 92 aminoácidos) fusionada con la β -D-galactosidasa. Esta estrategia preserva la expresión natural del gen, aunque el producto génico es inactivo y fácilmente detectable mediante el reportero β -D-galactosidasa. Con el fin de investigar el papel de AZIN2 en la biosíntesis y almacenamiento de 5-HT e Hia, hemos generado mastocitos BMMCs a partir de ratones *wild-type* y de ratones transgénicos con expresión hipomórfica del gen *Azin2*, analizando los contenidos de PA, Hia y 5-HT, así como algunos elementos de sus metabolismos. Como resultado, los BMMCs hipomórficos para la expresión de *Azin2* no mostraron importantes alteraciones fenotípicas a juzgar por su morfología y por las proteasas específicas de mastocitos. Sin embargo, al compararlos con los ratones control *wild-type*, estas células mostraron niveles reducidos de Spd y Spm, y una tasa de crecimiento disminuida. Asimismo, los niveles de 5-HT estaban reducidos, mientras que los niveles de Hia mostraron una tendencia a incrementarse. De acuerdo con esto, los niveles de ARNm y proteína de triptófano hidroxilasa (TPH1, la enzima clave de la biosíntesis de 5-HT) estaban disminuidos, mientras que la actividad enzimática histidina descarboxilasa (HDC, la enzima responsable de la biosíntesis de Hia) estaba incrementada. Además, los niveles del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), un elemento involucrado en la regulación de la expresión del gen *Tph1*, estaban reducidos. En conjunto, nuestros resultados muestran, por primera vez, que un elemento del metabolismo de las poliaminas –AZIN2–, ampliamente descrito como exclusivamente relacionado con el control de las concentraciones de PA, está también involucrado en la regulación de la biosíntesis y los niveles de otras aminas, como son 5-HT e Hia. Estos resultados configuran el capítulo I de la presente Tesis Doctoral, y se han publicado recientemente en la revista *Amino Acids* (Acosta-Andrade y cols., 2016).

Otro de los puntos importantes de regulación de los niveles de PA es su ruta de degradación. La espermidina/espermina N1-Acetiltransferasa (SSAT) es la enzima limitante en la interconversión de las PA. Esta enzima, al igual que la ODC, es inducible y presenta una alta tasa de recambio (Casero y Pegg, 1993). Su función es catalizar la N¹-acetilación de los residuos de aminopropilo de Spd y Spm utilizando acetil-CoA como donador de grupos acetilo. La acetilación marca las PA para su reutilización en la vía de interconversión o para su oxidación y excreción. La regulación de SSAT tiene lugar a múltiples niveles, incluidos la transcripción, el procesamiento y traducción del ARNm, así como la estabilización de la proteína (Pegg, 2008). Los niveles de PA ejercen su acción en todos los pasos del proceso, esto es, altos niveles llevan a un incremento en la transcripción y traducción de la SSAT, al mismo tiempo que se disminuye tanto su degradación como un procesamiento alternativo que produce codones de parada prematuros del transcrito. De este modo, son cuatro los puntos de control que se refuerzan para que los niveles de SSAT sean altos cuando los de PA también lo son. El responsable del aumento de la transcripción es un elemento de respuesta a PA que se activa cuando los niveles de PA son altos. En este proceso se ven implicadas dos proteínas, la primera es el factor 2 relacionado con el factor nuclear de eritrocitos (Nrf-2) mientras que la segunda es una proteína factor 1 modulada por PA (PMF-1) (Pegg, 2009). Asimismo, se han descrito otros factores implicados en su transcripción, como son sitios de unión de Sp1, a la proteína activadora -1 (AP-1) y proteína de unión a un elemento de respuesta a AMPc (*Cyclic Response Element Binding*, CREB) que ya se mencionaron para la regulación de ODC (Fogel-Petrovic y cols., 1993; Choi y cols., 2006). En cuanto a sus funciones, la SSAT se ha relacionado con el estrés oxidativo, dado que un exceso en la degradación de PA conlleva un aumento de peróxido de hidrógeno mediante la acción de las amino oxidasas. Por otro lado, en experimentos en los que la expresión de SSAT fue inducida en células de carcinoma de mama humano (MCF-7) se observaron cambios en la tasa de crecimiento de estas células (Vujcic y cols., 2000) mientras que en experimentos de nuestro grupo, en células de neuroblastoma se ha observado que un aumento de SSAT afecta a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a la funcionalidad de la cadena respiratoria y el estado de fosforilación de AKT, además de otras características morfológicas y celulares (Ruiz-Pérez y cols., 2015).

Una característica importante de la SSAT es que su expresión es relativamente baja, estando presente en pequeñas cantidades en diversos tipos celulares. Sin embargo, esta expresión puede ser inducida mediante el uso de análogos de Spm y de otras aminas (Green y cols., 1998; Uimari y cols., 2009). Por esta razón, la mayoría de las investigaciones sobre SSAT se han realizado con la ayuda de "superinductores" de la misma, esto es, análogos de PA que actúan como potentes inductores de la transcripción de SSAT como por ejemplo el N(1),N(11)-dietilnorespermina (DENSpm) (Tian y cols., 2012). Es interesante mencionar que se ha comenzado a estudiar los efectos de estos "superinductores" como posible tratamiento en fase 1 de pacientes con carcinoma hepatocelular (Goyal y cols., 2014). Además, SSAT puede ser inducida por diversas moléculas, como los factores paracrinós LIF e IGF-1 (Green y cols., 1998) y compuestos naturales como el resveratrol (Wolter y cols., 2003).

Muchos de los trabajos realizados mediante la inducción de SSAT se han realizado con líneas celulares tumorales, principalmente para investigar el papel de las PA en la proliferación celular. Sin embargo, pocos trabajos han descrito esas interacciones en modelos celulares humanos no proliferativos, tales como basófilos y mastocitos. En nuestro grupo de investigación, se pudo observar que la histamina era capaz de interferir en los sistemas de transporte de Spd, ejerciendo además efectos cooperativos con inductores de SSAT en mastocitos C57.1 (Fajardo y cols., 2001a). En esta línea, y dada la importancia que los niveles de PA parecen tener en la fisiología del mastocito (García-Faroldi y cols., 2009b y 2010), esto podría suponer una importante herramienta para su estudio y el de posibles interacciones de las PA con otras aminas biógenas en los gránulos de los mastocitos y basófilos en humanos. Asimismo, la inducción de SSAT podría afectar otros elementos ya descritos como el factor de respuesta a hipoxia 1α (HIF- 1α) y otros elementos del metabolismo de aminas biógenas.

Si bien los BMMCs de ratón son una herramienta muy útil, al trasladar el estudio de las interacciones PA y aminas biógenas en una estructura de membrana como son los gránulos de los mastocitos, también es cierto que presentan algunas limitaciones. Por otra parte, cabe destacar que algunas líneas celulares humanas de mastocitos no presentan el receptor Fc ϵ RI, por lo que no tienen la posibilidad de desgranular mediante estimulación con IgE. Esto supone no disponer de una herramienta muy importante en estudio de la dinámica de membranas y su fisiología. No obstante, existen otras líneas celulares de mastocitos, como la línea celular de mastocitos humanos LAD2, obtenida a partir de la médula ósea de un paciente con sarcoma/leucemia de mastocitos (Kirshenbaum y cols., 2003). Esta línea celular expresa Fc ϵ RI, CD4, 9, 13, 14, 22, 31, 32, 45, 64, 71, 103, 117, 132, CXCR4 (CD184), CCR5 (CD195), así como H1a, triptasa y quimasa. Además, liberan β -hexosaminidasa tras la agregación de Fc ϵ RI o Fc γ RI. Por todo ello, constituyen un modelo muy completo de mastocitos humanos con el que poder trabajar.

Por otro lado, los basófilos, debido a sus características similares a los mastocitos residentes en tejidos, y a su accesibilidad en sangre periférica, han sido una herramienta muy importante para caracterizar las funciones de los mastocitos y el proceso de la desgranulación (Crivellato y cols., 2011; Siracusa y cols., 2013). A principios de la década de 1980, los basófilos fueron identificados en ratones, y una década después, se utilizaron en estudios con ratones modificados genéticamente. Como resultado, se describió que los basófilos tienen un papel crítico en los procesos autoinmunes, inflamatorios y en la patogénesis de numerosas enfermedades (Sullivan y cols., 2011; Karasuyama y Yamanishi, 2014). Los basófilos, al igual que los mastocitos, derivan de células madre hematopoyéticas que residen en la médula ósea. A diferencia de éstos, no la abandonan sin completar su diferenciación, ya que cuando entran al torrente circulatorio lo hacen como células completamente maduras (Voehringer, 2013). Los basófilos son definidos, mediante sus marcadores principales, como células de linaje negativo (Lin⁻) CD34⁺, c-Kit⁺ (CD117). Asimismo, se han identificado dos poblaciones distintas de basófilos: (i) clásicos, estimulados por IL-3 que se activan eficientemente mediante mecanismos IgE dependientes, y (ii) basófilos limfopoyéticos del timo, IgE independientes (Siracusa y cols., 2011). Estas diferencias derivan de los precursores granulocito-monocito (GMP), unas células

presentes tanto en el timo como en la médula ósea, existiendo dos subtipos de las mismas en ambos tejidos. Ciertamente, aunque son muchos los factores que puedan llevar a la expresión de determinadas moléculas en los basófilos, ciertas citoquinas parecen guiar hacia fenotipos funcionales diferentes. Por ejemplo, la linfopoyetina tímica estromal (TSLP) ha mostrado mediar el reclutamiento de estas células a la piel en dermatitis atópica (Siracusa y cols., 2011) mientras que la IL-3 promueve su reclutamiento hacia ganglios linfáticos (Kim y cols., 2010).

El mecanismo más estudiado de activación de los basófilos es el de la estimulación mediante IgE de los receptores de alta afinidad FcεRI (Kraft y Kinet, 2007). En respuesta a la activación por IgE, los basófilos desgranulan rápidamente una gran variedad de moléculas efectoras, como Hia, IL-4, IL-13, leucotrienos y factor activador de plaquetas (Broide, 2001; Otsuka y cols., 2016). Aunque FcεRI es el principal receptor Fc en basófilos, éstos pueden activarse o inhibirse mediante otros receptores Fc, esto es FcγRIIA y FcγRIIB, respectivamente (Cassard y cols., 2012). Estos receptores activan quinasas intracelulares de la familia Src, como son Lyn, Fyn y Syk, para inducir una serie de cambios celulares (Bruhns y Johnson, 2015). Por todo ello, los basófilos humanos, al igual que los mastocitos, constituyen una importante herramienta para el estudio de los procesos de desgranulación y la fisiología de la serie granulocítica-monocítica, y por tanto, de todos aquellos procesos inmunológicos en los que ambos tipos celulares están implicados.

De manera resumida, los basófilos presentan la ventaja, frente a los mastocitos en humanos, de que este tipo celular llega ya maduro a la sangre periférica, no siendo necesario realizar cultivos ni proceso madurativo. Esto tiene una enorme ventaja, dado que una vez purificados los basófilos, pueden ser utilizados directamente en los experimentos requeridos. Por otra parte, estos pertenecen al linaje granulocítico-monocítico, y provienen de los mismos precursores (GMP), compartiendo muchas características fenotípicas, como la acumulación de componentes en sus gránulos y liberación del contenido de los mismos tras ser estimulados con IgE (Knol y Gibbs, 2014; Gibbs y Falcone, 2014). Por último, aunque se ha descrito que las PA están presentes en prácticamente todos los organismos vivos, es llamativo el hecho de que no haya nada publicado hasta la fecha acerca de las PA y basófilos, ni de ratón ni humanos. Por tanto, es una vía de investigación nueva abierta a futuros experimentos.

Por todo lo expuesto anteriormente, se decidió investigar el papel de SSAT y, por tanto de los niveles de PA, en un modelo humano, en relación con el proceso dependiente de membrana (desgranulación elicitada) y otras aminos biógenas. Como agentes inductores de SSAT, se propuso la posibilidad de utilizar resveratrol y DENSpm en basófilos humanos purificados y en la línea celular de mastocitos humanos LAD2. Como resultado, en ambos tipos celulares los compuestos produjeron una inhibición de la liberación de Hia por desgranulación elicitada con IgE/anti-IgE. Se investigó la posibilidad de que una sobreexpresión de SSAT produjese variaciones en varias proteínas del metabolismo de las aminos biógenas. Como resultado, sólo HIF1α y TPH1 mostraron diferencias significativas, disminuyendo su expresión. Por último, se intentó determinar los niveles intra- y extracelulares de PA mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Desafortunadamente, sólo se pudieron detectar los niveles extracelulares de Hia, que disminuyeron en ambos tratamientos de manera independiente de IgE/anti-IgE. Los niveles de aminos (PA, Hia y 5-HT) intracelulares no se pudieron detectar por este método, probablemente debido a un problema con la conservación de las muestras correspondientes. Futuros experimentos serán necesarios para elucidar los procesos moleculares por los que ambos compuestos inhiben el proceso de la desgranulación. Estos resultados configuran el capítulo II de la presente Tesis Doctoral, y los obtuvo el doctorando durante una estancia de tres meses realizada en el laboratorio del Doctor Bernhard Gibbs, Universidad de Kent, Reino Unido.

Muchas de las interacciones que establecen las PA con otras biomoléculas derivan de la particularidad de su estructura molecular. Esta estructura es relativamente simple, pero muy especial, dado que las cargas positivas de los átomos de nitrógeno se encuentran distribuidas a lo largo de la cadena carbonada flexible, lo cual posibilita las interacciones con biomoléculas

cargadas negativamente (Orberg y cols., 2007). Así, en el núcleo celular se cree que participan en el empaquetamiento del material genético y que aseguran la fidelidad de la transcripción del ADN, mientras que en el citosol modulan la síntesis proteica (Igarashi y Kashiwagi, 2015). Anteriormente se ha mencionado la importancia de las PA y su presencia en prácticamente la totalidad de los seres vivos. Sin embargo, en los últimos años ha ganado interés la posibilidad de que las PA estuviesen incluso antes que el propio origen de la vida. En base a esto, cabe destacar que algunos autores han conseguido identificar precursores de PA en algunos meteoritos, entre ellos el famoso Meteorito de Murchinson (Meierhenrich y cols., 2004). De manera más concreta, los compuestos ácido 2,3-diaminopropanoico, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 4,4'-diaminoisopentanoico, ácido 3,3'-diaminoisobutanoico y ácido 2,3-diaminobutanoico han sido identificados en extractos de cóndritos de este meteorito (Burton y cols., 2012) corroborando que es muy posible que las PA estuviesen presentes en un ambiente prebiótico.

Asimismo, recientemente se ha mencionado a las PA y su posible implicación en procesos moleculares clave en un ambiente prebiótico primitivo. En una elegante y reciente publicación, las PA han sido propuestas como una de las Moléculas e Iones Simples Universales (*Simple Universal Molecules and Ions*, SUMIs). Este grupo lo forman moléculas e iones universales que originalmente tuvieron un papel relevante para dar lugar a la primeras protocélulas. Las PA, por tanto, han sido propuestas para numerosos papeles clave en este proceso, tales como ser fuente de nitrógeno o bien colaborar como estructuras policatiónicas estabilizadoras de otras macromoléculas (Norris y cols., 2014). Es importante mencionar que no sólo las PA sino también sus posibles interactores podrían haber estado presentes en el mundo prebiótico, llevando a cabo algunos procesos moleculares importantes. Las teorías del origen de la vida afirman que es muy factible que los aminoácidos ya estuviesen presentes, así como otras biomoléculas similares a los nucleótidos. En este sentido, la descarboxilación de aminoácidos para producir aminas suele ser un proceso dependiente de compuestos similares a nucleótidos, como es el piridoxal-5'-fosfato (PLP). Este cofactor es capaz de reaccionar con aminas incluso en ausencia de proteínas (Cordes y Jencks, 1962). La dependencia de PLP está particularmente extendida en el metabolismo del nitrógeno en todos los organismos vivos, pues es cofactor de numerosas enzimas como sintetasas, liasas, racemasas y transferasas (Schneider y cols., 2000). Esto parece sugerir que este compuesto orgánico y las aminas derivadas de aminoácidos podrían estar en el origen del metabolismo del nitrógeno.

En cuanto a estructuras membranosas prebióticas, se han sugerido diferentes modelos. En los últimos años, se ha demostrado experimentalmente que es posible que cadenas alifáticas oxidadas, como son alcoholes alifáticos y ácidos grasos, serían capaces de formar vesículas lipídicas similares a las que pudieron estar presentes en la era prebiótica (Rendón y cols., 2012). Además, cabe destacar que la idea de un “mundo ARN”, esto es, un mundo primitivo donde las interacciones estaban mediadas por ARN autoreplicantes similares a ribozimas, está actualmente aceptada por la mayoría de la comunidad científica (Ruiz-Mirazo y cols., 2014). En términos generales, se acepta la hipótesis de que, en el origen de la vida y bajo condiciones azarosas pero favorables termodinámicamente, estas moléculas de ARN autocatalíticas y/o autoreplicantes quedaron encerradas en estructuras membranosas, proporcionándoles una ventaja evolutiva y dando lugar al último antecesor común universal (*Last Common Universal Ancestor*, LUCA; Penny y Poole, 1999; Forterre, 2015). Sin embargo, existen algunos interrogantes en este proceso primigenio que arrojan serias dudas acerca de la viabilidad del mismo. En principio, se cree que este proceso tuvo lugar ayudado en su mayoría por interacciones electrostáticas entre los elementos. No obstante, tanto ácidos nucleicos como ácidos grasos es muy probable que estuviesen cargados negativamente en un ambiente primitivo, y por tanto, las interacciones electrostáticas serían, en este caso, de repulsión. Debido a ello, ¿cómo es posible que una estructura como una protocélula pudiera formarse si no estaba favorecida por interacciones electrostáticas? ¿Existe la posibilidad de que algún tipo de molécula catiónica ayudase y/o tuviese un papel relevante en este proceso? Estas son preguntas importantes sobre el origen de LUCA que aún no han sido resueltas.

De manera resumida, existen numerosas evidencias que llevan a pensar que las PA y elementos de su metabolismo y/o regulación pueden tener un papel clave a la hora de interactuar con las membranas biológicas, en particular con estructuras como son los gránulos de los mastocitos. Una estructura que potencialmente puede interactuar con las PA son los proteoglicanos (PG). De hecho, se ha descrito una fuerte interacción entre la Spm con PG que contienen glucosaminoglucanos del tipo heparán sulfato/heparina (Belting y cols., 1996). Además, la incorporación de PA desde el medio extracelular depende de su interacción con PG de heparán sulfato de superficie (Belting y cols., 2002), y se ha demostrado que el glipican-1 es un tipo importante de PG que media en el transporte de PA en mamíferos (Belting y cols., 2003). Por todo ello, se puede hipotetizar que en los gránulos podrían existir interacciones clave entre elementos polianiónicos (PG de serglycina y membranas biológicas) y las PA (policationes alifáticas) siendo este tripartito responsable (al menos en parte) de la estabilidad de los mismos. Sin embargo, el estudio molecular de dichas interacciones entre tres elementos parece difícilmente abordable en este modelo, si bien, dentro del gránulo del mastocito, estos elementos conviven con muchísimos otros componentes que pueden complicar el análisis de dichas interacciones. No obstante, podrían estudiarse en profundidad las interacciones biofísicas de estos elementos en un sistema más sencillo, como son los liposomas.

Recientemente se ha demostrado que los liposomas son una herramienta muy útil como modelo de trabajo reproducible y bien caracterizado para el estudio de interacciones biofísicas entre elementos polianiónicos y policationicos, como las histonas y el ADN (Lete y cols., 2014 y 2015). Por tanto, se decidió utilizar este sistema, además de PA y ácidos nucleicos, para determinar si es posible que un tripartito liposomas-PA-ácidos nucleicos se formara en condiciones prebióticas. En resumen, el análisis de las interacciones electrostáticas de las PA podría suponer un importante avance en el conocimiento de: (i) las interacciones electrostáticas que pudieron favorecer la formación de una estructura parecida a LUCA, y (ii) el posible papel de las PA en la dinámica de membranas, siendo éste muy importante en estructuras membranosas fisiológicamente importantes, como en este caso, los gránulos de los mastocitos.

Por todo lo mencionado anteriormente, se han llevado a cabo determinaciones biofísicas con PA, liposomas y ácidos nucleicos. Se han testado las interacciones de las PA con fosfolípidos cargados negativamente [fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) entre ellos, abundante en la membrana nuclear] y con ácidos nucleicos (principalmente ARNt por razones prácticas). Las PA indujeron agregación de las vesículas lipídicas que contenían fosfolípidos ácidos y también de los ácidos nucleicos. La agregación se detectó utilizando métodos espectroscópicos y de microscopía de fluorescencia. Los complejos PA-liposoma fueron desagregados parcialmente cuando se añadieron ácidos nucleicos a la mezcla, indicando una competición de los lípidos y los ácidos nucleicos por las PA, en un fenómeno de equilibrio múltiple. Observaciones similares se obtuvieron cuando las vesículas estaban compuestas de ácido oleico y 1-decanol (proporción 1:1) en lugar de liposomas de fosfolípidos. Los datos aquí presentados podrían evocar posibles procesos de la evolución prebiótica, remitiendo a un sistema estable entre PA-membranas-ácidos nucleicos, en un modelo de funcionamiento *in vitro* acerca del posible origen de LUCA. En el otro extremo de la escala temporal, este sistema podría constituir una interesante herramienta en el desarrollo de distribución de fármacos a escala nanoscópica. Estos últimos resultados configuran el capítulo III de la presente Tesis Doctoral, y se han incluido en un manuscrito actualmente en revisión por la revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

Summary



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Ornithine-derived polyamines (PA), i.e., putrescine (Put) spermidine (Spd) and spermine (Spm), are aliphatic polycations which are present in almost all living beings (Cohen, 1998). PA are essential for growth and proliferation in eukaryotic cells, playing a key role in their metabolism which consist of concerted actions among different transporters and enzymes that carry out biosynthesis, catabolism, transport and/or degradation of a broad range of metabolites, all of them to assure PA intracellular levels homeostasis (Miller-Fleming et al., 2015). Among the most important enzymes in PA metabolism, ornithine decarboxylase (ODC) is widely accepted as the key enzyme of PA biosynthesis. ODC accomplish the first step, that is, decarboxylation of ornithine to form Put. Following formation of Put, aminopropyl groups are added to this diamine by spermidine synthase and spermine synthase, resulting in Spd and Spm synthesis, respectively. In both cases, aminopropyl groups are added from decarboxylated S-adenosylmethionine.

A bad regulation in PA levels can be lethal for cellular viability, not only by defect, but also by excess, since it has been described that high PA levels can induce cellular apoptosis (Poulin et al., 1995a). Therefore, PA levels are strictly regulated by their synthesis, catabolism degradation and transport. This regulation must be strict in different step of metabolism, with the aim of avoiding possible deleterious effects due to PA levels variations. One of the most important steps of regulation of ODC levels, and thereby of PA levels, is the ODC-antizyme-antizyme inhibitor system. ODC stability and activity is regulated indirectly by PA levels, through a mechanism in which proteins called antizymes (AZ) are involved. In mammals, AZ family presents three isoforms, namely AZ1, AZ2 y AZ3. In summary, AZ is a specific inhibitor protein of ODC, affecting its turnover rate being capable to form heterodimers with ODC and targeting it to degradation via 26S proteasome in an independent ubiquitin manner (Hayashi et al., 1996; Coffino, 2001). It is important to note that AZ is also capable to inhibit PA uptake by an unknown mechanism. Moreover, PA levels have an important effect in AZ self-regulation, since high PA levels stimulate AZ synthesis and inhibit its degradation (Mangold, 2005, 2006).

As occurs with ODC, AZ has its own inhibitory proteins. These proteins are called antizyme inhibitors (AZIN), this family is composed of two isoforms (AZIN1 and AZIN2). Both share high homology with ODC, but they have not decarboxylase activity. They are capable to heterodimerize with the three AZ isoforms, showing the AZIN-AZ complex more affinity than the ODC-AZ counterpart (Fujita, 1982). In this sense, AZIN proteins are very effective in preventing AZ inhibitory actions both over ODC (promoting ODC liberation to conform functional homodimers) and over PA uptake (López-Contreras et al., 2010). Regarding AZIN distribution, AZIN1 is expressed ubiquitously in many tissues, such as the liver, heart and kidney (Murakami et al., 1996; Mangold, 2006), whereas AZIN2, in contrast, is expressed more restrictively. It is expressed in some tissues as testis, brain, adrenal glands and pancreas (López-García et al., 2013). Curiously, AZIN2 is also expressed in some specific cell types, such as mast cells; in 2009 it was reported that AZIN2 is associated to mast cell granules (Kanerva et al., 2009).

PA are able to interact with other biogenic amines, such as histamine (Hia) and serotonin (5-HT). In contrast with PA, Hia and 5-HT are biogenic amines present just in few cell types, including some immune system cells and neurons. However, both PA and Hia have a common 1,4-diamine backbone, and share some similarities in their metabolic pathways: (i) they are produced by metabolizing cationic amino acids; (ii) the first step in their biosynthesis is a PLP-dependent decarboxylation; (iii) their catabolism may involve the action of common oxidases; (iv) S-adenosylmethionine (SAM) provides the aminopropyl and methyl groups in PA biosynthesis and Hia catabolism, respectively; and (v) they can both be covalently cross-linked to proteins by transglutaminases (Medina et al., 2003; Sánchez-Jiménez et al., 2007). All these

evidences suggest putative mutual interferences in their metabolisms. On the other hand, 5-HT is present in human and mouse mast cells (Meuer et al., 1981; Suteret et al., 2007; Papaliodis et al., 2008). Considering the number of evidences regarding the importance of PA and Hia for the granule physiology in mast cells (García-Faroldi et al., 2009a, 2010), it can be proposed that 5-HT might also play an important role in this scenario. Moreover, given the relatively recent description of different subtypes of granules in mast cells (Puri and Roche, 2008), AZIN2 was associated to a subtype of granules containing 5-HT and cathepsin D as principal markers. Overall, AZIN2 was proposed as a local regulator of PA biosynthesis in this subtype of granules containing 5-HT (Kanerva et al., 2009). Considering all the evidences described above, it seems that there is an interplay among PA and Hia and 5-HT metabolisms, even though it has not been well characterized yet. It is possible that these interactions depend on the particular tissues and/or cell types as well as environmental stimulus they could be subjected to.

At the same time, PA are able to interact not only with biogenic amines but also with membrane-related structures, e.g. PA uptake and transport system. Although PA intracellular levels depend on the biosynthesis and degradation pathways, transport mechanisms play also a key role in PA homeostasis. Indeed, the identification of PA transporter has been investigated for decades, but it remains currently one of the most important mysteries in PA field. Nevertheless, many studies have characterized the biochemical and molecular properties that this transporter should have, and recently it has even been proposed some putative models for the PA transporter (Poulin et al., 2012). It is important to note that many studies have demonstrated that low PA levels and/or high AZ levels lead to an increase on PA uptake (Kahana, 2009; Ramos-Molina et al., 2015). Furthermore, it has been reported that PA are able to interact with membrane transport proteins (Dela and Delcour, 1996; Yamaguchi et al., 2006).

Since late last century, only a few studies have been performed in relation to lipid vesicles and PA. In this sense, PA interactions have been described with vesicles composed of mainly phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol, using a wide range of experimental conditions (Schuber et al., 1983; Tadolini and Varani, 1986; Cohen, 1998). Recently, important advances regarding biophysical interactions between PA and lipid vesicles have been described (Finger et al., 2014). However, these interactions and its functional importance are still an obscure area of the molecular and cellular biology, particularly in animals in which a specific PA transporter has not been described yet (Abdulhussein and Wallace, 2014). In a more practical manner, the advance in the characterization of these molecular interactions previously described, could improve the research in many scientific and biotechnological areas; for instance, in the inflammatory or neuroendocrine regulation (Kanerva et al., 2009), in signalling mechanisms modulated by PA (Coburn, 2009), including those mechanisms related to cancer (Gilmour, 2007; Ruiz-Pérez et al., 2015), as well as PA-based therapies (Chen et al., 2006). From all the studies aforementioned, there are evidences that PA and PA-related elements play a key role as structure and dynamic membrane modulators.

On the other hand, PA are also capable to interact with nucleic acids and proteins, since these are polyanionic macromolecules. PA can function as regulators of gene expression due to their ability to interact with proteins as well as to stabilize and modify chromatin structure (Childs et al., 2003). Moreover, PA are also able to modulate transcription rate (Thomas et al., 1995) and the binding of proteins to DNA (Panagiotidis et al., 1995), and are also able to bind and produce structural changes in RNA (Igarashi and Kashiwagi, 2010). Furthermore, it is important to note that Spd is also a hypusine precursor, this is, a covalent activator of eIF-5A factor (Kaiser, 2012). In the last 20 years many biophysical works has been made to determine the most probable conformational dispositions of Spd and Spm in their

interactions with genomic DNA and other fragments of DNA with different lengths and sequences (Basu et al., 1996; Cohen, 1998; Ruiz-Chica et al., 2001 y 2003). Briefly, PA are able to stabilize DNA double strand and to induce conformational transitions from B to Z, even forming cholesteric phases in GC-enriched sequences (Ruiz-Chica et al., 2001). Recently, it has been published an interesting review about biophysical studies focussed on interactions between PA and RNA, in relation with direct functional consequences (Lighfoot & Hall, 2014).

Mast cells could be an interesting model to determine PA interactions with other elements, such as biogenic amines and/or membranes. In this cell type, the most remarkable and distinctive feature is the presence of secretory granules filled with a wide array of molecules termed as "mediators". After mast cell activation for degranulation, these cells can accomplish almost all their functions through the release to extracellular media of these compounds; thus, these compounds elicit physiologic and physiopatologic events associated to this cell type (Wernersson and Pejler, 2014). Human mast cells are widely distributed in some organs and tissues, being particularly present in those in contact with external media, such as the lungs, the skin and the gastrointestinal tract. However, mast cells represent just 1% of total immune cells (Cardamone et al., 2016). Moreover, due to the fact that mast cells are totally differentiated only in local tissues, it is very difficult to isolate them and obtain a reasonable quantity to work with. In the previous years, it has been increased the number of publications which make use of BMMCs instead of cell lines (Malbec et al., 2007). BMMCs have been considered for many authors as similar to mast cell mucosa-like or mouse MMC. BMMCs express FcεRI, FcγRIIA and FcγRIIB receptors, and release mediators stored in granules by IgE elicitation, being widely used in degranulation process studies (Benhamou et al., 1990; García-Faroldi et al., 2009b). Furthermore, these studies have allowed to analyze a broad variety of components present within the granules and their related functions (Wernersson and Pejler, 2014). Our research group have been working for years with BMMCs. We have demonstrated that PA affect to Hia synthesis during early stages of differentiation in BMMCs using IL-3 (García-Faroldi et al., 2009a). Moreover, we could observe that PA are present in secretory granules of mast cells, being important for the store and release of Hia and in 5-HT levels (García-Faroldi et al., 2010).

As it was previously mentioned, AZIN2 has been described to be present in mouse mast cell granules, associated to the 5-HT subtype of granules, being postulated as a local regulator of biosynthesis of PA (Puri and Roche, 2008; Kanerva et al., 2009). During the last years, Dr. Rafael Peñafiel's research group (University of Murcia) have improved the knowledge about AZIN2 role working with a transgenic mouse model hypomorphic for the *Azin2* gene (Lopez-García et al., 2013). In brief, these mice have a truncated version of the *Azin2* gene fused with the bacterial *lacZ* gene (coding for β-D-galactosidase) under the control of the natural *Azin2* gene promoter. Using this strategy, instead of expressing the *Azin2* gene product, these mice produce a recombinant protein which is an inactive truncated version of AZIN2 (containing only the first 92 starting aminoacids) fused to the bacterial β-D-galactosidase. In this way, the physiological expression of the *Azin2* gene is preserved, although the gene product is inactive and easily detectable by the reporter the β-D-galactosidase. To gain insight into the role of AZIN2 in the biosynthesis and storage of 5-HT and Hia, we have generated BMMCs from both wild-type and transgenic *Azin2* hypomorphic mice, and have analyzed PA, 5-HT and Hia contents, and some elements of their metabolisms. *Azin2* hypomorphic BMMCs did not show major mast cell phenotypic alterations as judged by morphology and specific mast cell proteases. However, compared to wild-type controls, these cells showed reduced Spd and Spm levels, and diminished growth rate. 5-HT levels were also reduced, whereas Hia levels tended to increase. Accordingly, tryptophan hydroxylase-1 (TPH1; the key enzyme for 5-HT biosynthesis) mRNA expression and protein levels were reduced, whereas HDC (the enzyme responsible for Hia biosynthesis) enzymatic activity was increased. Furthermore, microphthalmia-associated transcription factor, an element involved in

the regulation of *Tph1* expression, was reduced. Taken together, our results show, for the first time, an element of polyamine metabolism –AZIN2–, so far described as exclusively devoted to the control of PA concentrations, involved in regulating the biosynthesis and content of other amines like 5-HT and Hia. These results make up the chapter I of the present Doctoral Thesis, and have been published in *Amino Acids* journal (Acosta-Andrade et al., 2016).

Another important step of regulation of PA levels is the PA degradation pathway. Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase (SSAT) is the key enzyme for PA turnover. This enzyme, similar to ODC, is inducible and shows a high turnover rate (Casero and Pegg, 1993). Its function is to catalyze the N₁-acetylation of aminopropyl residues of Spd and Spm using acetyl-CoA as donor of acetyl groups. In this way, PA are tagged by acetylation in order to recycle them or for oxidation and excretion. SSAT regulation takes place at multiple levels, including transcription, splicing and translation of mRNA as well as protein stabilization (Pegg, 2008). PA levels affects all these steps on SSAT processing, i.e., increased PA levels lead to an increase in SSAT transcription and translation, together with a reduction of its degradation, and even a reduction on an alternative processing that produces premature stop codons of mRNA. Therefore, there are four checkpoints, which are reinforced to assure that SSAT levels increase in response to high PA levels. The responsible of an increase of transcription in this scenario is a PA-related response element that is activated when PA levels are elevated. In this process two proteins are implicated; the first one is the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2), whereas the second one is protein modulated factor 1 by PA (PMF-1) (Pegg, 2009). Besides, it has been described that there are other factors involved in its transcription, like binding sites for Sp1, AP-1 and nuclear binding factor to CREB, that were mentioned for ODC regulation (Fogel-Petrovic et al., 1993; Choi W et al., 2006). Regarding the SSAT functions, this protein has been involved with oxidative stress, due to the fact that an excess in PA degradation led to an increase of hydrogen peroxide by means of amino oxidases action. On the other hand, experiments performed with breast carcinoma human cells (MCF-7) showed a decrease in growth rate by inducing SSAT expression (Vujeic et al., 2000). Accordingly, in experiments performed in our research group, we could observe that an increase of SSAT expression affects to ROS accumulation, to respiratory chain functions and phosphorylation state of AKT, apart from other morphological and cellular features in neuroblastoma cells (Ruiz-Pérez et al., 2015).

An interesting feature of SSAT is that it is expressed at very low levels, being present in low quantities in different cell types. Nevertheless, SSAT expression can be induced with the concurrence of Spm analogs and other amines (Green et al., 1998; Uimari et al., 2009). For this reason, most of research about SSAT have been performed with the help of “superinductors” of SSAT, i.e., PA analogs which acts as potent inductors of SSAT transcription, as for example N(1),N(11) - diethylnorspermine (DENSpm) (Tian et al., 2012). It is remarkable to mention that these “superinductors” and their effects have been selected as a putative treatment in carcinoma hepatocellular patients, currently in phase one of clinical trials (Goyal et al., 2014). Furthermore, SSAT can be induced by different molecules, such as paracrine factors LIF and IGF-1 (Green et al., 1998) or natural derived compounds as resveratrol (Wolter et al., 2003).

Most of the works that were carried out using SSAT induction have been performed with tumour cell lines, mainly to investigate the role of PA in cellular proliferation. However, few research have described these interactions in non-proliferative human cell models, such as basophils and mast cells. In previous research of our group, we could observe that Hia was capable to interfere with the Spd transport system, also producing cooperative effects with SSAT inductors in the mouse mast cell line C57.1 (Fajardo et al., 2001). In line with these findings, and considering the importance of PA levels in mast cell physiology (García-Faroldi et al., 2009b and 2010), SSAT overexpression could mean an interesting tool for the study of

mast cell physiology, and also for the study of possible interactions of PA with other biogenic amines in human mast cell and basophils granules. Moreover, SSAT induction could affect to other elements previously described as HIF-1 α and other elements of biogenic amines metabolism.

Although mouse BMMCs are a very useful research tool, since they allow transferring the study of PA interactions and biogenic amines into a membrane structure such as mast cell granules, it is also true that they present a number of limitations. On the other hand, it is important to mention that some human cell lines of mast cells do not express Fc ϵ RI receptor, so they have no possibilities to degranulate upon stimulation with IgE. For this reason, these cells without Fc ϵ RI represent the absence of an important tool to study the dynamic and physiology of membranes. Nevertheless, there exist other mast cell lines, such as the human mast cell line LAD2, obtained from bone marrow aspirates from a patient with mast cell sarcoma/leukemia (Kirshenbaum et al., 2003). This cell line express Fc ϵ RI, CD4, 9, 13, 14, 22, 31, 32, 45, 64, 71, 103, 117, 132, CXCR4 (CD184), CCR5 (CD195), as well as Hia, tryptase, and chymase. In addition, these cells release β -hexosaminidase following Fc ϵ RI or Fc γ RI aggregation. Therefore, this cell line represents is a very useful model of human mast cell to work with.

On the other hand, basophils, due to their similar features to resident mast cells in the tissues, together with their accessibility by purification from peripheral blood, have been a very important tool to characterize mast cell functions and the process of degranulation (Crivellato et al., 2011; Siracusa et al., 2013). At the very beginning of 80's decade, basophils were indentified in mice, and in 90's basophils were used in studies with genetically modified mice. As a result, it was described that basophils play a critical role in autoimmune processes, in inflammation and in the pathogenesis on a broad range of pathologies (Sullivan et al., 2011; Karasuyama and Yamanishi, 2014). Basophils, like mast cells, are derived from hematopoietic stem cells within the bone marrow. Basophils, however, do not leave the bone marrow until they are completely differentiated; then, they enter the circulating blood as mature basophils (Voehringer, 2013). Basophils are defined by their most important markers, such as negative lineage cells (Lin⁻) CD34⁺, c-Kit⁺ (CD117). Moreover, two different populations of basophils have been described: (i) classic basophils, stimulated by IL-3 and efficiently activated by means of IgE dependent mechanisms, and (ii) lymphopoietic basophils from thymus, IgE independent (Siracusa et al., 2011). Mainly, these cell types derive from granulocytic-monocytic precursors (GMP), i.e., cells present both in thymus and bone marrow, existing two subtypes of each in both tissues. Certainly, despite there are many factors that could elicit the expression of particular molecules in basophils, some cytokines seem to lead to different functional phenotypes. For example, stromal thymic lymphopoietin (TSLP) has been demonstrated to mediate in the recruitment of basophils to the skin in atopic dermatitis disease (Siracusa et al., 2011) whereas IL-3 promotes basophils recruitment to lymphatic ganglia (Kim et al., 2010).

The most studied activation mechanism of basophils is stimulation of high affinity receptors Fc ϵ RI by IgE (Kraft and Kinet, 2007). In response to IgE activation, basophils quickly degranulate a broad range of molecular effectors, as Hia, IL-4, IL-13, leukotriens and platelets activator factor (Broide, 2001; Otsuka et al., 2016). Although Fc ϵ RI is the main Fc receptor in basophils, this cell type can be activated or inhibited by other Fc receptors, i.e., Fc γ RIIA and Fc γ RIIB, respectively (Cassard et al., 2012). These receptors activate intracellular kinases of the Src family, such as Lyn, Fyn and Syk, to induce a range of cellular changes (Bruhns and Johnson, 2015). For all these reasons, human basophils, like human mast cells, represent a very important tool for the study of the degranulation processes and the physiology of the granulocytic-monocytic series, and therefore, all immunological processes in which both cell types are implicated.

In brief, compared to human mast cells, basophils offer the important advantage that they arrive completely differentiated and mature to peripheral blood, and therefore it is not necessary to prepare cell cultures or to carry out a maturation process. This represents a key advantage in research, due to the fact that once basophils are purified, they can be used directly for the required experiments. On the other hand, basophils belong to the granulocytic-monocytic lineage, and derive from the same precursors (GMP), sharing many phenotypic features with mast cells, like the accumulation of diverse components in their granules and the release of them after stimulation with IgE (Knol and Gibbs, 2014; Gibbs and Falcone, 2014). Finally, despite PA have been described as being present in almost all living organisms, it is remarkable the fact that there are no publications to date regarding PA and basophils, neither in mouse nor in humans. Therefore, this is a new investigation line open to further experiments.

For all the evidences aforementioned, it was proposed to investigate the putative role of SSAT and, therefore, of PA levels, in a human model in relation with membrane dependent processes (i.e. elicited degranulation) and other biogenic amines. As inducer factors of SSAT, it was proposed to use resveratrol and DENSpm in human purified basophils and in the human mast cell line LAD2. As a result, the compounds produced an inhibition on Hia release after IgE/anti-IgE elicited degranulation in both cell types. It was also investigated the possibility that an overexpression of SSAT lead to variations on some proteins related with the biogenic amine metabolisms. As a result just HIF1 α and TPH1 protein levels showed significant differences, reducing their expression levels. Finally, attempts were made to determine intra- and extracellular levels of PA using a HPLC method. Unfortunately, only extracellular Hia levels were detected, and these levels diminished under both treatments in an IgE/anti-IgE independent manner. The intracellular of PA, Hia and 5-HT could not be detected by this method most probably due to a problem related with the preservation of the corresponding samples. Further experiments will be required to address the molecular processes by which both compounds inhibit the degranulation pathway in human mast cells and basophils. The results presented here configure the Chapter II of the present Doctoral Thesis, and the PhD student performed them during a research international stay carried out at the Laboratory of Dr. Bernhard Gibbs, University of Kent, United Kingdom.

Most of the interactions that PA establish with other biomolecules derive from their particular molecular structure. PA structure is relatively simple, but very particular, due to the fact that positive charges in the nitrogen atoms are distributed along the carbon flexible chain, which allows PA to interact with negatively charged biomolecules (Orberg et al., 2007). Thus, it is thought that within the cellular nucleus PA participate in genetic packaging, also assuring the fidelity of DNA transcription, whereas PA modulate protein synthesis in the cytosol (Igarashi and Kashiwagi, 2015). Previously, it has been mentioned the importance of PA and its presence in almost the whole living beings. However, during the last years, researchers have focussed on the possibility that PA existed even before the origin of life. In relation to this assumption, it is remarkable that some authors have identified PA precursors in some meteorites, among them the famous Murchinson meteorite (Meierhenrich et al., 2004). In particular, the compounds DL-2,3-diaminopropanoic acid, DL-2,4-diaminobutanoic acid, 4,4'-diaminoisopentanoic acid, 3,3'-diaminoisobutanoic acid, and 2,3-diaminobutanoic acid were identified in hot-water extracts of chondrite meteorites (Burton et al., 2012). So, these evidences corroborate that PA might be present in a prebiotic environment.

Accordingly, there are publications that mention PA as implicated in key molecular events in a prebiotic primitive environment. In an elegant and recent publication, PA have been proposed as one of the Simple Universal Molecules and Ions (SUMIs). These SUMIs are composed of a group of universal molecules and ions, which originally had a key role to generate early protocells. PA, therefore, have been proposed to assume many key roles in life

origin, such as being the main source of nitrogen or to collaborate as polycationic structures on the stabilization of other macromolecules (Norris et al., 2014). It is important to mention that not only the PA but also their possible interactors might have been present in a prebiotic scenario, performing some important molecular processes. Origin of life theories affirm that it is feasible that aminoacids were already present, together with other nucleotide-like biomolecules. In this sense, aminoacids decarboxylation to produce amines uses to be an event which depends on compounds similar to nucleotides, such as pyridoxal 5-phosphate (PLP). This cofactor is able to react with amines even in the absence of proteins (Cordes and Jencks, 1962). PLP dependence is widely extended in nitrogen metabolism in all living organisms, due to the particularity that it is cofactor of a broad range of enzymes, including synthases, lyases, racemases and transferases (Schneider et al., 2000). This suggests that this organic compound and the aminoacid derived amines could be present in the origin of nitrogen metabolism.

Regarding prebiotic membrane structures, several putative models have been proposed. During the last years, it has been demonstrated experimentally that oxidized aliphatic chains, i.e., aliphatic alcohols and fatty acids, would be able to form lipid vesicles similar to those that might be present in the prebiotic age (Rendón et al., 2012). Moreover, it is remarkable that the idea of a RNA world, i.e., a primitive world where interactions were mediated by self-replicating RNA similar to ribozymes, it is currently accepted for the majority of the scientific community (Ruiz-Mirazo et al., 2014). In general terms, it is accepted the hypothesis which describes that, in the origin of life and under random but thermodynamically favourable conditions, these self-catalytic and/or self-replicant RNA molecules were enclosed in membrane structures, providing them an evolutionary advantage and giving rise to the Last Universal Common Ancestor (LUCA, as it is widely known; Penny and Poole, 1999; Forterre, 2015). However, it still remains some unanswered questions in this primal process, which questionate the viability of this hypothesis. First of all, it is believed that this process took place mainly helped by electrostatic interactions between the elements. Nevertheless, both nucleic acids and fatty acids were most probably negatively charged in a prebiotic environment, and therefore, the electrostatic interactions would be of the repulsion type. Due to this assumption, how is it possible that a complex structure like a protocell could arise if it was not favoured by electrostatic interactions? Does exist the possibility that any kind of cationic molecule helped to and/or had a key role in these molecular events? These are relevant questions about LUCA and origin of life that still remain elusive.

Briefly, there are many evidences indicating that PA and elements of their metabolism and/or regulation could exert a key role in the line of interactions with biologic membranes, in particular with structures such as mast cell granules. A potentially PA interactor within the granules are proteoglycans (PG). In fact, it has been described a close interaction between Spm and PG containing glucosaminoglycans of the heparan sulphate/heparine type (Belting et al., 1996). Furthermore, PA uptake from the extracellular media depends on PA interactions with surface heparan sulphate PG (Belting et al., 2002). It has also been demonstrated that glypican-1 is an important PG which mediates PA transport in mammals (Belting et al., 2003). Based on all these evidences, it can be hypothesized that within the granules key interactions could exist between polyanionic elements (serglycin PG and biological membranes) and PA (aliphatic polycations), being this tripartite responsible (at least in part) of granule stability. However, the molecular study of all these interactions among three elements is difficult to achieve in this model, since these elements share a scenario with a huge plethora of compounds within the mast cell granules that would complicate the correct analysis of these interactions. Nevertheless, biophysical interactions among these three elements could be studied in depth by using an easier model as, for instance, the concurrence of liposomes.

Recently, it has been demonstrated that liposomes are a very useful and reproducible tool as a work model. These liposomes are well characterized to study biophysical interactions

between polyanionic and polycationic elements, such as DNA and histones (Lete et al., 2014 and 2015). In consequence, this system was chosen, besides PA and nucleic acids, to determine the possibility of formation of liposomal-PA-nucleic acids tripartite under prebiotic experimental conditions. Overall, the analysis of electrostatic interactions of PA could provide important insights into the knowledge about: (i) electrostatic interactions that could favor formation of an structure similar to LUCA, and (ii) the putative role of PA in membrane dynamics, being this role of PA very important in relevant physiological membrane structures, such as in the granules mast cells.

For all the evidences mentioned above, we have performed experiments to elucidate the biophysical characterization of interactions among PA, liposomes and nucleic acids. We have tested the interaction of PAs with negatively charged phospholipids (e.g. PIP₂, abundant in the nuclear membrane), and with nucleic acids (mainly tRNA was used for practical reasons). PAs induced aggregation of lipid vesicles containing acidic phospholipids, and of nucleic acids. Aggregation was detected using both spectroscopic and fluorescence microscopy methods (the latter with giant unilamellar vesicles). PA-liposome complexes were partially disaggregated when nucleic acids were added to the mixture, indicating a competition of lipids and nucleic acids for PAs, in a multiple equilibrium phenomenon. Equivalent observations could be made when vesicles composed of oleic acid and 1-decanol (1:1 mol ratio) were used instead of phospholipid liposomes. The data could evoke putative primitive processes of proto-biotic evolution, referring to a stable PA-membranes-nucleic acids system, in an *in vitro* functioning model of the putative origin of LUCA. At the other end of the time scale, the system may constitute an interesting tool in the development of nanoscale drug delivery. These last results are presented in Chapter III of the present Doctoral Thesis, and have been recently accepted in *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* journal.

Introducción general



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Las poliaminas: unas moléculas esenciales para la vida

1.1. Introducción

Las poliaminas fueron descritas por primera vez en 1678 por Antoni van Leeuwenhoek en base a la formación de cristales en muestras del fluido seminal. Si bien fueron redescubiertas varias veces en los dos siglos siguientes, no fue hasta 1878 que se identificó su presencia en varios tejidos de mamíferos (Cohen, 1998). Las poliaminas (PA) derivadas de la ornitina, esto es, putrescina (Put) espermidina (Spd) y espermina (Spm) son policationes alifáticas que se encuentran presentes en prácticamente todos los seres vivos. Sus estructuras químicas se muestran en la Figura 1.

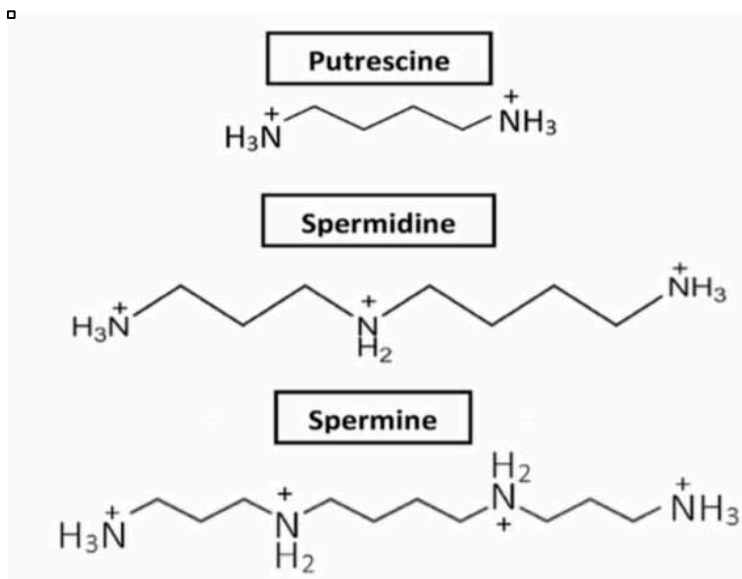


Figura 1. Poliaminas derivadas de la ornitina, putrescina (superior), espermidina (intermedio) y espermina (inferior). Tomada de Acosta-Andrade y cols., 2017 (ver Anexo III).

Las PA son importantes en la expresión génica debido a su habilidad para unirse a ácidos nucleicos y proteínas, y por tanto, también son capaces de estabilizar y remodelar la estructura de la cromatina (Childs y cols., 2003). Asimismo, son capaces también de modular la tasa de transcripción (Thomas y cols., 1995), la unión de proteínas al ADN (Panagiotidis y cols., 1995) y de unirse y producir cambios estructurales en el ARN (Igarashi y Kashiwagi, 2010). Además, parece ser que tienen un papel esencial en la traducción en *E. coli* (Yoshida y cols., 2002) y mamíferos (Yoshida y cols., 2004; Bachrach, 2005) así como en la fosforilación de factores relacionados con la traducción (Landau y cols., 2010). En cuanto a la proliferación y crecimiento celular, ya desde 1957 se reconoce su importancia en estos procesos (Kihara y Snell, 1957). En bacterias, una disminución de las concentraciones de Put y Spd da lugar a una reducción en la tasa de crecimiento (Cunningham-Rundles y Maas, 1975; Xie y cols., 1993) mientras que esto provoca una parada en la proliferación celular en eucariotas (Odenlund y cols., 2009). Otro papel de las PA en este proceso es la relación que posee la Spd como sustrato para una modificación postraduccional esencial, denominada hipusinación, y el factor eIF-5A, esenciales en eucariotas (Park y cols., 2010).

Por otro lado, las células están continuamente expuestas a diferentes tipos de estrés; ya sea por productos de su metabolismo o por agentes externos, se producen variaciones en

especies reactivas de oxígeno, pH, presión osmótica y temperatura. En este sentido, las PA han sido asociadas como respuesta y protección frente a todo tipo de estrés (Mitchell y cols., 1998) tanto en plantas como en animales. Las PA tienen la capacidad de acumular y eliminar especies reactivas de oxígeno (Sava y cols., 2006; Rider y cols., 2007), unirse a proteínas de transporte de membrana (Dela y Delcour, 1996; Yamaguchi y cols., 2006) e intervenir en la regulación de efectores relacionados con la respuesta al estrés en bacterias (Chiang y cols., 2012) levaduras (Kruger y cols., 2013) y eucariotas (Sagor y cols., 2013).

En humanos, las PA se han relacionado solamente con una enfermedad genética, el síndrome de *Snyder-Robinson*, el cual ha sido ligado directamente a un defecto genético en la biosíntesis de PA. Esta enfermedad es un desorden raro ligado al cromosoma X que causa retardo mental debido a mutaciones en el gen que codifica para la Spm (espermidina sintasa). Como resultado, linfocitos y fibroblastos presentan niveles reducidos de Spm, dando lugar a variaciones en el ratio Spd/Spm, y por tanto, a retardo mental, osteoporosis, asimetría facial e hipotonía (Cason y cols., 2003). Debido a la importancia de las PA en numerosos mecanismos moleculares, es considerable el número de enfermedades humanas que han sido asociadas a las PA, particularmente en cáncer (Dunzendorfer y Russell, 1978, Russell, 1971). A pesar de que numerosas observaciones han demostrado niveles elevados de PA en sangre de pacientes de cáncer, aún no se ha confirmado que las PA puedan ser usadas como un marcador pronóstico de la enfermedad (Gerner y Meyskens, 2004).

Además de en patologías como el cáncer, los niveles de PA están aumentados en enfermedades neurodegenerativas. De hecho, un incremento de PA tiene efectos citotóxicos y puede dar lugar a la formación de metabolitos tóxicos, como aldehídos y peróxido de hidrogeno, conocidos efectores neurodegenerativos (Wood y cols., 2007; Pegg, 2013). Además, el incremento de PA en la enfermedad de Parkinson o en el Alzheimer podría deberse simplemente a un mal funcionamiento del complejo del proteosoma, un rasgo distintivo de estas enfermedades (Dantuma y cols., 2014). Por último, en algunos organismos, incluyendo levaduras y humanos, los niveles de PA disminuyen con la edad, sin embargo, parece ser que restaurar los niveles de PA es beneficioso (Vivó y cols., 2001). La suplementación con Spd ha demostrado incrementar la esperanza de vida en *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* y células mononucleares de sangre periférica (Eisenberg y cols., 2009).

1.2. Metabolismo de las poliaminas.

El metabolismo de las PA consiste en una serie de acciones concertadas entre diversas enzimas y transportadores que llevan a cabo la biosíntesis, catabolismo, transporte y/o eliminación de un amplio rango de metabolitos, todo ello para asegurar la homeostasis de los niveles de PA intracelulares (Miller-Fleming y cols., 2015). Las principales reacciones metabólicas de las PA se esquematizan en la Figura 2.

1.2.1. Síntesis de poliaminas.

Entre las enzimas más importantes del metabolismo de PA, la ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17) es generalmente aceptada como la enzima clave de su biosíntesis. La ODC lleva a cabo el primer paso, esto es, la descarboxilación de la ornitina para formar Put (Figura 2). A su vez, el precursor de la ornitina en vertebrados es el aminoácido arginina, que por acción de la arginasa (EC 3.5.3.1) se hidroliza en urea y ornitina. De manera alternativa, existe otra vía mediante la que puede obtenerse Put a partir de la descarboxilación de la arginina por la arginina descarboxilasa (ADC; EC 4.1.1.19) para dar agmatina, que a continuación se hidroliza por la agmatinasa (EC 3.4.3.11) dando como producto Put y urea. Si bien esta ruta se



1.2.2. Vía de interconversión de poliaminas.

27

Las funciones de este biciclo son, por un lado, la excreción de PA a través de los N-acetil derivados, y por otro lado una vía de recuperación de la Spd y Put cuando las condiciones fisiológicas lo requieren. Se ha descrito también la existencia de una espermina oxidasa (SMO; EC 1.5.3.11) que puede oxidar directamente la Spm a Spd (Wang y cols., 2016; Vujcic y cols., 2003).

1.2.3. Transporte de poliaminas.

Si bien los niveles de PA intracelulares dependen de las vías de síntesis y degradación, los mecanismos de transporte también juegan un papel muy importante. En este sentido, se ha venido investigando durante décadas para identificar el transportador de las PA, siendo a día de hoy una de las incógnitas más importantes en este campo. Sin embargo, numerosos estudios han caracterizado las propiedades bioquímicas y moleculares que debería de tener dicho transportador, e incluso en los últimos años se han descrito algunos posibles modelos para el transportador de PA.

Es a partir de mediados de la década de 1980 en la que el interés por los transportadores de PA en mamíferos se incrementó notablemente. Se aportaron fuertes evidencias de que estos transportadores estaban relacionados con el gen *IDH2* (Adair y Siciliano, 1985) mientras que otros autores afirmaban que en dicho transportador podían estar implicados varios genes (Byers y cols., 1989). Asimismo, se ha descrito que la regulación del transporte de PA está mediada por las concentraciones intracelulares de las mismas. Por tanto, un descenso en los niveles de PA induce un aumento de la velocidad de incorporación. Además, existen evidencias de que se trata de un transportador saturable, muy dependiente de la carga energética celular y que presenta una alta afinidad por el sustrato, generalmente en un rango comprendido entre 10^{-7} y 10^{-5} M (Byers y Pegg, 1989).

En los años siguientes se describieron otras características de este transportador, como que altas concentraciones de cationes monovalentes (Li^+ , Na^+) actúan como inhibidores del transporte de PA (Poulin y cols., 1995b), o su dependencia del potencial de la membrana plasmática (Poulin y cols., 1998; Dot y cols 2000). Además, un factor estrictamente necesario para el transporte activo de Put y Spd es la presencia de al menos uno de los siguientes cationes divalentes, en orden de eficiencia $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > > > \text{Co}^{2+}$ (Minchin y Martin, 1997). A nivel molecular, los residuos tiol y carboxilo en el transportador de PA parecen ser claves para el correcto funcionamiento de este transportador, como lo demuestran experimentos realizados con bloqueantes para estos residuos, como son N-etilmaleimida y 1,3-diciclohexylcarbodiimida, respectivamente, que inhiben el transporte de PA (Seiler y cols., 1996; Torossian y cols., 1996).

Una de las características diferenciales del transporte de PA es el valor de pH óptimo para el transporte de cada poliamina. Mientras que el transporte de Spd funciona mejor a pHs ligeramente ácidos (6.0-7.0) el transporte de Put disminuye su actividad hasta un 70% a esos valores, siendo óptimo a valores de pH más próximos a la alcalinidad (7.2-8.2) (Brachet y cols., 1995; Poulin y cols., 1995b). Estas diferencias en el perfil de pH óptimo para el transporte podría sostener la idea de que existen dos tipos diferentes de transportadores para PA. Relacionado con esto y con las concentraciones de cationes monovalentes, se llegó como consenso a la posible existencia de dos tipos de transportadores, esto es, a) transportadores de Put o con preferencias por las diaminas, o b) transportadores de Spd o Spm o verdaderos transportadores de PA (Seiler, 2003). Asimismo, algunos miembros de la familia SLC7 (la mayoría permeasas para lisina/arginina/ornitina) y de la familia SLC22 (como SLC22A3, el transportador de monoaminas extraneuronal) han sido relacionados con la pertenencia a alguno de estos grupos (Koepsell y cols., 2007).

En la última década, varios grupos de investigación han propuesto algunos modelos hipotéticos para el transportador de PA (Figura 3). Por un lado, se propone un modelo en el que las PA entran en la célula mediante una permeasa de la membrana plasmática para PA y su posterior incorporación a vesículas intracelulares (Soulet y cols., 2004). Un segundo modelo consiste en que, en el caso de la Spm, ésta se una a los grupos heparán sulfato del glipican-1, para posteriormente producirse la internalización y finalmente ser liberada por la vía mediada por la oxidación de óxido nítrico (Belting y cols., 2003). Por último, recientemente se ha propuesto un modelo que implicaría la internalización dependiente de caveolina-1 de PA unida a un posible receptor de PA, en la que también intervendría el óxido nítrico (Uemura y cols., 2010).

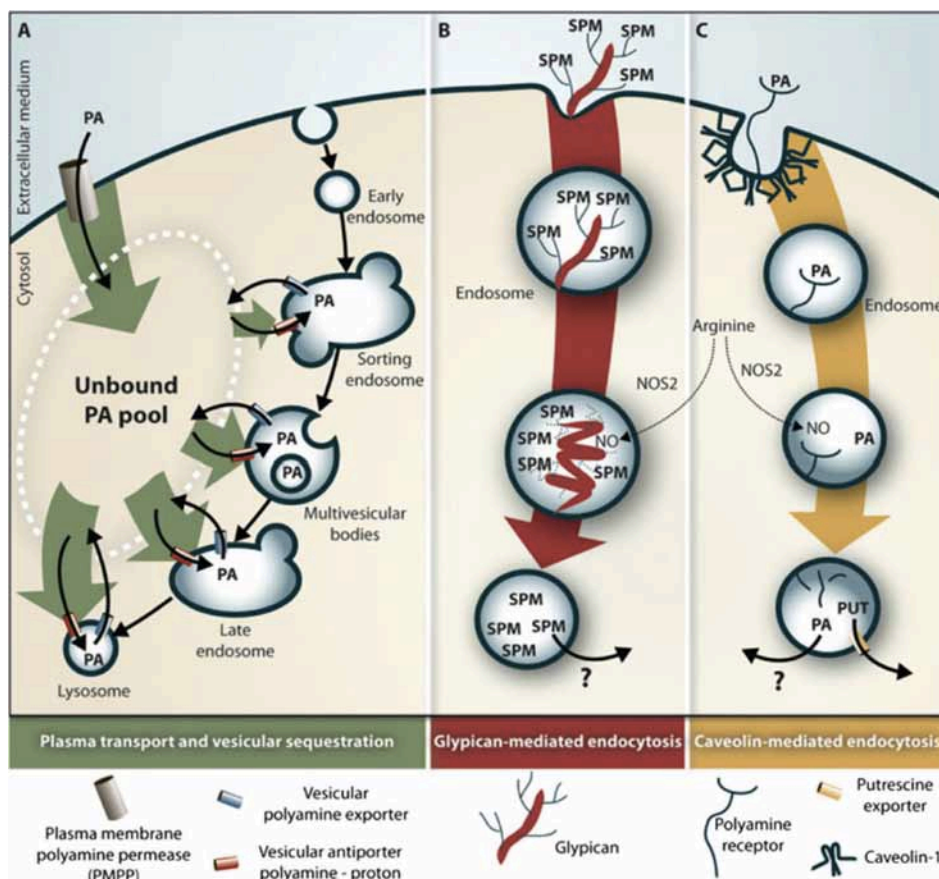


Figura 3. Modelos propuestos para el mecanismo de incorporación de PA. A) Mecanismo de dos pasos para transporte e incorporación vesicular, adaptada de Soulet y cols., 2004. B) Modelo basado en la unión de Spm a grupos glipican-1 del heparán sulfato, siendo internalizada posteriormente y liberada por mediación de la oxidación de óxido nítrico, adaptado de Belting y cols. 2003. C) Modelo dependiente de caveolina-1 para la internalización de PA, unidas a un posible "receptor de PA" (adaptado de Uemura y cols. 2010). Figura adaptada de Poulin y cols., 2012. NOS2 (óxido nítrico sintasa 2), PA (poliaminas), PUT (putrescina), SPM (espermina)

A pesar de la importante incógnita que supone que el transportador de PA no esté bien caracterizado aún, una de las características más notables es el papel regulador que los propios niveles de PA, al igual que otros elementos de su metabolismo, ejercen en el transporte de las mismas. Una de las proteínas implicadas en la regulación postraduccional de la ODC es la antizima (AZ), en alguna de sus tres isoformas (AZ1, AZ2, AZ3). Aunque la regulación de la actividad de la ODC se describirá ampliamente en el apartado 1.3, aquí cabe destacar numerosos estudios que han demostrado que bajos niveles de PA y/o altos niveles de AZ conllevan un aumento de la incorporación de PA exógenas (Kahana, 2009; Ramos-Molina y cols., 2015).

1.3. Regulación de los niveles intracelulares de poliaminas.

Una mala regulación de los niveles de PA puede ser letal para la viabilidad celular, ya no solo por defecto, sino también por exceso, pues se ha descrito que altos niveles de PA pueden inducir apoptosis celular (Poulin y cols., 1995a). Por eso, los niveles de PA están finamente regulados a través de su síntesis, degradación y transporte. Esta regulación ha de ser muy estricta y en diferentes puntos de su metabolismo, a fin de evitar los posibles efectos deletéreos debidos a variaciones en los niveles de PA.

1.3.1. Ornitina descarboxilasa (ODC)

La ODC está compuesta de dos subunidades que conforman un homodímero, con una masa molecular de 51 kDa cada monómero, si nos referimos a la ODC de mamíferos. Su localización subcelular es mayoritariamente citosólica (Pegg y cols, 1982) aunque algunos autores la han descrito también en el núcleo (Bartholeyns, 1983). Como cofactor utiliza el piridoxal-5'-fosfato (PLP), al igual que muchas otras descarboxilasas de L-aminoácidos (Moya-García y cols., 2005). La ODC de mamíferos es una de las enzimas con vida media más corta (10-50 minutos, aproximadamente) (Heby y Persson, 1990) y su expresión y actividad enzimática están sujetas a una regulación muy estricta (Cohen 1998; Medina y cols. 2003) por lo que sus niveles pueden variar drásticamente en varios órdenes de magnitud en cuestión de minutos.

Aunque la mayor parte de la regulación a corto y medio plazo ocurre a nivel traduccional y post-traduccional (Urdiales y cols., 2001), algunos estudios también han descrito que existe regulación a nivel transcripcional (Pegg, 2006). Así, existen varios factores que llevan a un aumento del ARNm de la ODC, como puede ser: el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a través de secuencias con elementos de respuesta al mismo (CREB); motivos CAAT, sitios de unión de las proteínas activadoras 1 y 2 (AP-1, AP-2), así como una caja TATA y sitios de unión del factor de transcripción Sp1 (Zhao y Butler, 2001; Qin y cols., 2004). En dicha regulación también intervienen genes relacionados con la proliferación como es *c-myc*, de tal forma que un aumento de actividad en el complejo de transcripción Myc/Max conlleva un aumento en la expresión de la ODC (Nilsson y cols., 2004). Por otra parte, las altas concentraciones de PA inhiben de forma global la síntesis de proteínas (Igarashi y Kashiwagi, 2015), y aunque las bajas concentraciones también afectan a este proceso, la ODC es más sensible a las bajas concentraciones y su síntesis se afecta más (Shantz y Pegg, 1999).

1.3.2. Antizima e inhibidor de antizima

Uno de los puntos de regulación más importantes de los niveles de ODC y, por tanto, de PA, es el sistema ODC-antizima-inhibidor de antizima (Figura 4). La estabilidad y actividad de ODC viene regulada por los niveles de PA de manera indirecta, a través de un mecanismo de acción en el que intervienen unas proteínas denominadas antizimas (AZ; ya mencionadas en el apartado 1.2.3) e inhibidores de antizima (AZIN). En mamíferos, la familia de AZ presenta tres isoformas, llamadas AZ1, AZ2 y AZ3. Tanto AZ1 como AZ2 están distribuidas de manera ubicua a lo largo de los tejidos, aunque AZ2 presenta un nivel de expresión mucho menor. Por otro lado, la expresión de AZ3 está restringida a los testículos durante algunas fases de la espermatogénesis (Mangold, 2005).

En general, AZ es una proteína inhibidora específica de ODC que afecta a su tasa de recambio, siendo capaz de unirse a los monómeros de ODC y llevarlos a degradación mediante el proteasoma 26S de forma independiente de ubiquitinación (Hayashi y cols. 1996; Coffino, 2001). Esta unión a los monómeros conlleva que no se formen los dímeros activos. Además,

esta unión provoca un cambio conformacional en la ODC, dejando expuesto el extremo carboxilo terminal, el cual contiene una región PEST [esto es, una región rica en prolina, glutamato, serina, treonina y aspartato, y flanqueada por aminoácidos básicos, que suele estar presente en los extremos de proteínas inestables (Rechsteiner y Rogers, 1996)]. Como resultado, la ODC es degradada en péptidos de 5 a 11 aminoácidos (Li y Coffino, 1993). Cabe destacar también que AZ es capaz de inhibir la incorporación de PA mediante transporte (como se mencionó en el apartado 1.2.3), por un mecanismo aún no caracterizado (Mangold, 2005). Los niveles de PA tienen un efecto importante en la propia regulación de AZ, dado que altos niveles de PA estimulan su síntesis e inhiben su degradación. La regulación de AZ viene determinada por un cambio en la pauta de lectura (Kahana, 2009) o *frameshifting*, estimulado por los niveles de PA. De manera análoga, estos niveles inhiben el proceso de ubiquitinación, necesario para la degradación de AZ (Landau y cols., 2010).

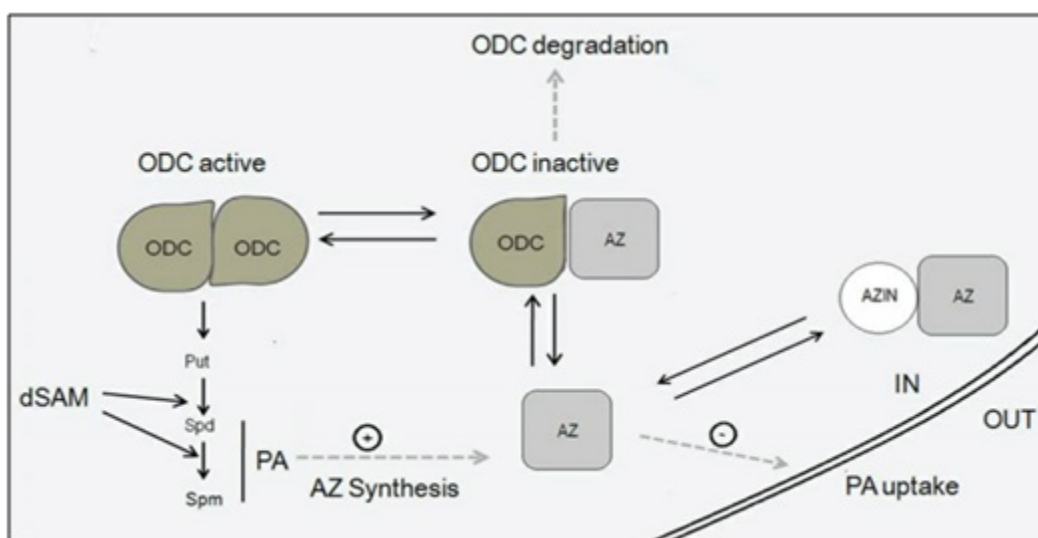


Figura 4. Regulación de los niveles de poliaminas dependiente del sistema ODC-antizima-inhibidor de antizima. PA (poliaminas), ODC (ornitina descarboxilasa), AZ (antizima), AZIN (inhibidor de antizima). Figura tomada de Acosta-Andrade y cols. (2017)

Asimismo, AZ posee sus propias proteínas inhibidoras, tal y como le ocurre a ODC (Figura 4). Éstas son denominadas inhibidores de antizima (AZIN) y esta familia consta de dos isoformas (AZIN1 y AZIN2). Ambas poseen una alta homología con ODC, pero sin actividad descarboxilasa. Son capaces de unirse a las tres isoformas de AZ, y tienen en particular que la unión AZIN-AZ posee mayor afinidad que la unión ODC-AZ (Fujita, 1982). De esta manera, las proteínas AZIN son muy efectivas impidiendo las acciones inhibitoras de AZ tanto sobre ODC (promoviendo por tanto su liberación para la formación de homodímeros funcionales) como sobre el transporte de PA (López-Contreras y cols., 2010).

En cuanto a la distribución de AZIN, AZIN1 es casi ubicuo, expresándose en muchísimos tejidos entre los que se destacan hígado, corazón y, en menor medida, riñones (Murakami y cols., 1996; Mangold, 2006), mientras que AZIN2, en contraste, se expresa de manera mucho más restringida. Algunos de los tejidos donde se expresa AZIN2 son el testículo, cerebro, glándulas adrenales y páncreas (López-García y cols., 2013). Curiosamente, AZIN2 también se expresa en algunos tipos celulares específicos, como los mastocitos. En el año 2009, se describió la presencia de AZIN2 en los gránulos de los mismos, proponiéndose que podría actuar como un regulador local de la biosíntesis de PA en gránulos asociados a 5-HT (Kanerva y cols. 2009).

1.3.3. Espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa

La espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT; EC 2.3.1.57) es la enzima limitante en la interconversión de las PA. Esta enzima, al igual que la ODC, es inducible y presenta una alta tasa de recambio (Casero y Pegg, 1993). Su función es catalizar la N¹-acetilación de los residuos de aminopropilo de Spd y Spm utilizando acetil-CoA como donador de grupos acetilo. La acetilación marca las PA para su reutilización en la vía de interconversión o para su oxidación y excreción.

La regulación de SSAT tiene lugar a múltiples niveles, incluidos la transcripción, el procesamiento y traducción del ARNm, así como la estabilización de la proteína (Pegg, 2008). Los niveles de PA ejercen su acción en todos los pasos del proceso, esto es, altos niveles llevan a un incremento en la transcripción y traducción de la SSAT, al mismo tiempo que se disminuye tanto su degradación como un procesamiento alternativo que produce codones de parada prematuros del transcrito. De este modo, son cuatro los puntos de control que se refuerzan para que los niveles de SSAT sean altos cuando los de PA también lo son.

El responsable de este aumento de la transcripción es un elemento de respuesta a PA que se activa cuando los niveles de PA son altos. En este proceso se ven implicadas dos proteínas, la primera es el factor 2 relacionado con el factor nuclear de eritrocitos (Nrf-2) mientras que la segunda es una proteína factor 1 modulada por PA (Pegg, 2009). Asimismo, se han descrito otros factores implicados en su transcripción, como son sitios de unión de Sp1, AP-1 y proteína de unión a CREB, que ya se mencionaron para la regulación de ODC (Fogel-Petrovic y cols., 1993; Choi y cols., 2006)

En cuanto a sus funciones, la SSAT se ha relacionado con el estrés oxidativo, dado que un exceso en la degradación de PA conlleva un aumento de peróxido de hidrógeno mediante la acción de las amino oxidasas. No obstante, la Spm ha sido descrita también como un facilitador en la degradación de las especies reactivas de oxígeno o ROS (Ha y cols., 1998). Asimismo, se ha descrito que dado que la acción enzimática de SSAT consume acetil-CoA, esta enzima podría estar relacionada con el metabolismo lipídico. Animales *knock out* para SSAT presentan un fenotipo obeso, mientras que se ha observado que la sobreexpresión de SSAT da lugar a una importante disminución de tejido adiposo (Jell y cols., 2007). Por otro lado, en experimentos en los que la expresión de SSAT fue inducida en células de carcinoma de mama humano (MCF-7) se observaron cambios en la tasa de crecimiento de estas células (Vujicic y cols., 2000) mientras que en experimentos de nuestro grupo, la inducción de la expresión de SSAT en células de neuroblastoma afectó a la respiración de estas células (resultados no publicados).

Una característica importante de la SSAT es que su expresión es relativamente baja, estando presente en pequeñas cantidades en diversos tipos celulares. Sin embargo, esta expresión puede ser inducida mediante el uso de análogos de Spm y de otras aminas (Green y cols., 1998; Uimari y cols., 2009). Por esta razón, la mayoría de las investigaciones sobre SSAT se han realizado con la ayuda de "superinductores" de la misma, esto es, análogos de PA que actúan como potentes inductores de la transcripción de SSAT como por ejemplo el N(1),N(11)-dietilnoespermina (DENSpm) (Tian y cols., 2012). Es interesante mencionar que se ha comenzado a estudiar los efectos de estos "superinductores" como posible tratamiento en fase 1 de pacientes con carcinoma hepatocelular (Goyal y cols., 2014). Además, SSAT puede ser inducida por diversas moléculas, como los factores paracrinos LIF e IGF-1 (Green y cols., 1998) y compuestos naturales como el resveratrol (Wolter y cols., 2003).

Muchos de los trabajos realizados mediante la inducción de SSAT se han realizado con líneas celulares tumorales, principalmente para investigar el papel de las PA en la proliferación

celular. Sin embargo, pocos trabajos han descrito esas interacciones en mastocitos. En nuestro grupo de investigación, se pudo observar que la histamina era capaz de interferir en los sistemas de transporte de Spd, ejerciendo además efectos cooperativos con inductores de SSAT en mastocitos C57.1 (Fajardo y cols., 2001a). En esta línea, y dada la importancia que los niveles de PA parecen tener en la fisiología del mastocito (García-Faroldi y cols., 2009b y 2010) esto podría suponer una importante herramienta para su estudio y el de posibles interacciones con otras aminas biógenas en los gránulos de los mastocitos. Asimismo, la inducción de SSAT podría afectar otros elementos ya descritos como HIF-1 α y la tasa de proliferación. Por último, en neuroblastoma se ha observado que un aumento de SSAT afecta a la acumulación de ROS, a la funcionalidad de la cadena respiratoria y el estado de fosforilación de AKT, además de otras características morfológicas y celulares (Ruiz-Pérez y cols., 2015). Por tanto, sería muy interesante estudiar si esas mismas variaciones podrían ser reproducibles en un tipo celular completamente diferente, como es el mastocito.

2. Aminas biógenas. Histamina y serotonina

2.1. Histamina. Introducción, metabolismo y funciones fisiológicas

2.1.1. Funciones fisiológicas y distribución

Desde su descubrimiento a comienzos del siglo XX (Dale & Laidlaw, 1910), la Hia ha sido una de las moléculas más estudiadas en medicina (Parsons y Ganellin, 2006) debido a que juega un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos y patológicos como inflamación, alergias, relaciones de hipersensibilidad, secreción gástrica y neurotransmisión, entre otras (Jones, 2016).

La histamina (Hia; 2-(4-imidazol) etilamina) es una amina biógena de acción corta involucrada en numerosos procesos fisiológicos y patológicos (Ohtsu, 2010). La producción de Hia se ha asociado históricamente a los mastocitos, donde es almacenada en los gránulos y liberada en respuesta a diversos estímulos inmunológicos y no inmunológicos (Kakavas y cols., 2006; Riley y West, 1952). La Hia se produce también en otros tipos celulares, como células enterocromafines gástricas (Prinz y cols., 2003), varios tipos de células de la sangre, como basófilos (Falcone y cols., 2006), macrófagos, células dendríticas, linfocitos (Zwadlo-Klarwasser y cols., 1994) y plaquetas (Masini y cols., 1998), así como en condrocitos (Maslinska y cols., 2004), neuronas (Lethbridge y Chazot, 2010; Tiligada y cols., 2011) e incluso células tumorales (Falus y cols. 2001).

La función más característica de la Hia es el papel clave que tiene en las reacciones de hipersensibilidad. Esta amina biógena puede provocar, por un lado, la contracción de los musculatura lisa de los bronquios y del intestino, mientras que por otro lado es capaz de relajar los vasos sanguíneos periféricos. Estos efectos se explican principalmente por la interacción de la Hia con los receptores de Hia 1 y 2 (H1R y H2R). Otra función bien conocida de la Hia es su papel regulador de la secreción ácida gástrica. Las células de tipo enterocromafín (ECL) de la mucosa oxíntica liberan, tras su estimulación por gastrina, Hia, que activa los receptores H2R localizados en las células parietales secretoras de ácido (Brunton, 1996).

La Hia también juega un papel importante como neurotransmisor del sistema nervioso central (SNC). Así, se ha propuesto la existencia de un sistema histaminérgico en el SNC que, en base a los efectos observados con el empleo de antagonistas de Hia, estaría implicado en la regulación de la excitación, la temperatura corporal y la dinámica vascular (Parmentier y cols., 2002). Las neuronas que contienen Hia pueden participar en la regulación de la ingestión de líquidos, la secreción de la hormona antidiurética o vasopresina, el control de la presión arterial y la percepción del dolor.

Desde hace décadas se ha propuesto que la Hia está implicada en el crecimiento tumoral (Kahlson y Rosengren, 1968), habiéndose observado incluso que el uso de antihistamínicos en carcinomas, linfomas y fibrosarcomas de ratón disminuía el crecimiento de estos tumores (Gifford y cols., 1981). Paralelamente, se ha descrito ampliamente que en numerosos casos los tumores aparecen rodeados de mastocitos (Conti y cols., 2007; Galli y Tsai, 2008; Huang y cols., 2008) siendo la Hia uno de los componentes principales de los gránulos que se liberan en respuesta a diversos estímulos. Se ha propuesto que estos mastocitos podrían tener un papel relevante en el desarrollo de la angiogénesis tumoral (Meininger, 1995), relacionándolo directamente con el crecimiento de los tumores, la invasión y la metástasis (Folkman, 1990, 1995). Existen indicios de que son las proteasas de mastocitos y otros de sus mediadores los que están más directamente implicados en este proceso (Coussens y cols., 1999), si bien no puede descartarse un posible papel de la Hia. Como prueba de ello, existen estudios en los que la Hia es capaz de activar la angiogénesis en algunos modelos experimentales (Norrby, 1995).

2.1.2. Receptores de histamina

Al igual que la serotonina, la variedad de funciones de la Hia está determinada por su interacción con diversos receptores específicos en numerosos tejidos y/o tipos celulares. Existen 4 subtipos de receptores de histamina (H1R – H4R) (Parsons y Ganellin, 2006; Walter y Stark, 2012). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G similares al de la rodopsina (Clase A) y difieren entre ellos en su distribución tisular, propiedades de unión de ligando, señalización celular y funciones fisiológicas.

El H1R está acoplado a la proteína G_q que activa a la fosfolipasa C y la vía de activación de fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP_2). Sus acciones intervienen en la contracción del íleon, modulan el ciclo circadiano, la vasodilatación sistémica y la broncoconstricción (Shimamura y cols., 2011). El H2R está acoplado a la proteína G_s que responde al incremento de calcio intracelular. Sus acciones intervienen en el ritmo sinusal, la estimulación de la secreción ácida gástrica, la relajación del músculo liso e inhibe la proliferación de células T y citoquinas (Hill y cols., 1997). El H3R está presente casi exclusivamente en cerebro. Está acoplado a una proteína G_i y su activación da lugar a la inhibición de la formación de AMPc. Asimismo, las subunidades β y γ interactúan con canales de voltaje tipo N regulados por calcio intracelular, para reducir el potencial de acción y la liberación de neurotransmisores. Además, H3R funciona como un autoreceptor presináptico de las neuronas histaminérgicas (Bakker, 2004). Su diversa distribución a lo largo del cortex y subcortex indica que es capaz de modular la liberación de un gran número de neurotransmisores, como por ejemplo dopamina, el ácido γ -aminobutírico (GABA), acetilcolina, noradrenalina y 5-HT (Arrang y cols., 1983; Schlicker y cols., 1988; Hattar y cols., 1997).

La identificación y clonación en el año 2000 de un nuevo receptor para la Hia, H4R, renovó el interés por explicar observaciones relacionadas con la inflamación crónica, así como papeles atribuidos erróneamente a los receptores H1R y H2R (Tiligada, 2012). Al igual que H3R, con el cual comparte un 37% de homología de secuencia de aminoácidos, H4R está acoplado a una proteína G_i . Este receptor se expresa predominantemente en células de origen hematopoyético, como eosinófilos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, células dendríticas, monocitos y células T (Zampeli y Tiligada, 2009). La afinidad que presenta este nuevo receptor por la Hia a bajas concentraciones pudo establecer una explicación acerca de variaciones extracelulares de Hia que eran capaces de activar la desgranulación de mastocitos en rangos de concentración entre 100 y 1000 veces menores que los descritos para los anteriores receptores (Gutzmer y cols., 2011). Por tanto, se concluyó que H4R podría tener un papel importante en relación con alergias, inflamación, desórdenes autoinmunes y, muy posiblemente, cáncer (Thurmond y cols., 2008).

2.1.3. Metabolismo de la histamina

La enzima clave en el metabolismo de la Hia es la histidina descarboxilasa (HDC; EC 4.1.1.22), la cual lleva a cabo la descarboxilación del aminoácido L-histidina, catalizando así la biosíntesis de Hia. En cuanto a su catabolismo, se produce fundamentalmente por la N-metilación del anillo imidazol mediada por la enzima histamina-N-metil transferasa (HNMT; EC 2.1.1.8), que utiliza S-adenosilmetionina (SAM) como donador de alta energía del grupo metilo, seguida de desaminación oxidativa del grupo amino primario por la MAO, dando lugar a 3-metilimidazol acetaldehído que es transformado en ácido metilimidazol-acético por la aldehído deshidrogenasa (ADH) (Medina y cols., 1999; Rodríguez-Caso y cols., 2003). Otra posible vía de degradación de la Hia es aquella en la que el grupo amino primario sufre, por acción inespecífica de la diamina oxidasa (DAO; EC 1.4.3.6), una desaminación oxidativa directamente (Babe, 1996). A menudo esta actividad diamina oxidasa es denominada actividad “histaminasa”, la cual se incluye en el grupo de amina oxidasas dependientes de cobre capaces de oxidar PA (Morgan, 1998). El producto final de este catabolismo es ácido imidazol-acético. En ambos casos, los productos finales del catabolismo de la Hia tienden a combinarse con ribosa y son eliminados por la orina.

2.1.4. Regulación de la biosíntesis de histamina: histidina descarboxilasa (HDC)

La HDC de mamíferos es una enzima minoritaria, de corta vida media y parece ser tan inestable como la ODC de mamíferos. Además, al igual que la ODC, la HDC es una enzima PLP-dependiente que se presenta como un homodímero en mamíferos (Ohmori y cols., 1990). En cuanto a su localización, la HDC se expresa preferentemente en mastocitos, aunque puede encontrarse en otros tipos celulares como las células enterocromafines y algunas neuronas, lo que justifica la presencia de Hia en tejidos como el estómago y cerebro, donde desempeña importantes papeles fisiológicos y patológicos (Tsolakis y cols., 2015).

La regulación de la HDC es extremadamente compleja y no se conoce completamente. Los niveles finales de HDC activa están regulados tanto a nivel transcripcional, como traduccional y postraduccional. La HDC posee 2 regiones PEST, una amino-terminal y otra carboxilo-terminal, estando ambas relacionadas con su degradación proteolítica (Engel y cols., 1996). Asimismo, en la región promotora del gen de la HDC se localizan, entre otros elementos probables de regulación, una caja GC y otra TATA, cuatro cajas CACC y cuatro secuencias consenso GATA, además de un motivo de unión de *c-Myb* (Hocker y cols., 1996; Nakagawa y cols., 1997). Así, se ha observado que el factor 4 de tipo Kruppel (KLF-4) inhibe el promotor de la HDC a través de tres elementos: la caja GC y dos GAS-RE (Ai y cols., 2004). La unión del factor de transcripción Sp1 con la caja GC juega un papel importante en la expresión de la HDC. Se ha observado que KLF4 interacciona con Tip60 (una histona acetiltransferasa) y HDAC7 (una histona desacetilasa) formando un complejo que reprime la expresión de HDC al unirse a la caja GC. Esta unión se ve reducida al estimular con gastrina, a pesar de que los niveles de ARNm de KLF4 y HDAC7 aumentan con este tratamiento, posiblemente debido a que la gastrina aumenta los niveles de Sp1 (Gerhard y cols., 2001) que compete con el complejo KLF4/Tip60/HDAC7 por la caja GC (Ai y cols., 2004).

La regulación de la transcripción de HDC en células hematopoyéticas es bastante desconocida en comparación a la regulación por gastrina en células gástricas. Únicamente se ha descrito que el factor nuclear E2 (NF-E2) parece estar implicado en esta regulación de manera indirecta (Ohtsu y cols., 1996). En este estudio, mastocitos de la línea P815 incubados en la cavidad peritoneal adquirieron características de mastocitos del tejido conectivo aumentando los niveles de ARNm de HDC y de la proteasa 6 de mastocitos de ratón (*mouse mast cell protease-6*, mMCP6), al tiempo que disminuían los niveles de ARNm de NF-E2.

Asimismo, se ha descrito un elemento de respuesta a hipoxia en el promotor de la HDC de mastocitos que permite la unión del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), lo que conlleva que en condiciones de hipoxia se dé un aumento en los niveles de HDC (Jeong y cols., 2009; Fan y cols., 2011). Además, la expresión de HDC en mastocitos y basófilos parece ser consecuencia del estado de metilación del promotor (Kuramasu y cols., 1998).

La expresión de la HDC también se encuentra regulada a través de un control postraduccionnal como lo demuestran estudios con la línea de mastocitos HMC-1 (Oh y cols., 2001) y con la línea de células hematopoyéticas pluripotentes UT7D1 (Dy y cols., 1999). En la identificación de HDC, los trabajos publicados hasta el momento parecen sugerir la presencia de dos formas principales de la HDC: una de 74 kDa que corresponde al producto primario de traducción de la HDC capaz de dimerizar, pero inactivo, y una segunda forma mayoritaria de 53-55 kDa con plena actividad enzimática. Pero además existen formas intermedias, también activas, que pueden ser procesadas por ambos extremos (Garcia-Faroldi y cols., 2009b). No obstante, todavía queda por dilucidar si las distintas bandas observadas *in vivo* son consecuencia de un procesamiento secuencial o alternativo a partir del precursor, y qué diferencias específicas de células o tejidos existen.

La localización intracelular de las distintas formas de HDC es otro punto de recurrente discusión. Se ha descrito en células RBL-2H3 que la forma completa de la HDC aparecía asociada tanto a la membrana del retículo endoplásmico RE/Golgi como en el citosol, mientras que la forma de 53 kDa se encontraba asociada a la membrana del RE/Golgi y a los gránulos (Tanaka y cols., 1998). Además, otros autores han conseguido co-localizar en gránulos una forma de 53 kDa de la HDC y la metaloproteínasa-9 de la matriz en leucocitos polimorfonucleares que presentan alta actividad HDC (Tanaka y cols., 2004). Por otro lado, este mismo grupo identificó una posible señal de localización al RE en un fragmento de 10 kDa del extremo carboxilo de la secuencia de la HDC (Suzuki y cols., 1998). También se ha descrito que esta señal de localización permite no sólo el transporte de la HDC al RE, sino también la orientación de la enzima (Furuta y cols., 2006) siendo ésta importante para su funcionalidad.

2.2. Serotonina. Introducción, metabolismo y funciones fisiológicas

2.2.1. Funciones fisiológicas y distribución

En 1937, el fisiólogo italiano Vittorio Erspamer describió una sustancia denominada enteramina, la cual estaba presente en extractos aislados de mucosa gástrica y células enterocromáfines. Esta sustancia era capaz de inducir la contracción del músculo liso en el intestino de ratón y rata (Vialli y Erspamer, 1937). Unos años después, Maurice Rapport aisló y purificó una sustancia que causaba contracción de los vasos, y fue denominada serotonina (del latín, *serum* y de griego, *tonic*) (Rapport y cols., 1948). Posteriormente, se demostró que enteramina y serotonina eran la misma sustancia, y el término serotonina se mantiene en uso (Erspamer y Asero, 1952).

La amina biógena serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) posee un papel clave en la modulación de funciones fisiológicas en el sistema nervioso central y periférico, como son el sueño, la agresividad, el estado anímico, el dolor, la presión sanguínea y el apetito (Yildirim y Derksen, 2013). Actúa como una hormona en varios tejidos, es un mitógeno (promueve la proliferación y división celular) así como un neurotransmisor y neuromodulador (Fidalgo y cols., 2013; Ramakrishna y cols., 2011). Principalmente, la 5-HT ejerce sus efectos a través de sus receptores. Hasta la fecha, se han descrito siete subfamilias (5-HT₁₋₇) que incluyen catorce receptores diferentes para mamíferos. Con la salvedad del canal catiónico 5-HT_{3R}, todos los receptores para 5-HT son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G

(*G protein coupled receptors*, GPCR) y están ligados a diferentes efectores intracelulares vía múltiples proteínas G heterotriméricas (Barnes y Sharp, 1999; Nichols y Nichols, 2008).

La mayor parte de las investigaciones realizadas acerca de la 5-HT se han relacionado con su papel en cerebro. La 5-HT es una molécula muy importante que actúa tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Filogenéticamente, la 5-HT se encuentra entre los sistemas más antiguos de neurotransmisión tanto en vertebrados como en invertebrados (Hay-Schmidt, 2000; Turlejski, 1996). En este sentido, las neuronas serotoninérgicas juegan un papel clave en los ciclos de vigilia-sueño, el humor, las emociones, regulación de ciclos alimenticios y la termorregulación, y se relacionan con condiciones patológicas como depresión e insomnio (Jha y cols., 2005).

Cabe destacar que otra de las funciones atribuidas a la 5-HT es su papel como mediador clave en la señalización entre el sistema nervioso y el sistema inmune (Mössner y Lesch, 1998). Ya en la década de 1960 se relacionó la 5-HT y sus receptores con los mastocitos y la hipersensibilidad e inflamación (Enerbäck, 1965). Más recientemente, se ha demostrado que cambios en las concentraciones de 5-HT ocurridos en la inervación sensitiva y en rutas metabólicas en el SNC dan lugar a dolor e hipersensibilidad (Zhang y cols., 2007).

La 5-HT está contenida en vesículas citoplasmáticas de las células enterocromafines (Ahern y cols., 2011) así como en plaquetas y mastocitos, siendo la 5-HT uno de los factores liberados cuando estas células son activadas (Meuer y cols., 1981; Papaliodis y cols., 2008). Asimismo, la liberación de serotonina contenida en los gránulos de mastocitos está posiblemente regulada por las concentraciones de calcio, un efecto claramente destacado tanto en líneas celulares como en mastocitos aislados del peritoneo de ratón (Gordon y Galli, 1991).

2.2.2. Metabolismo de la serotonina.

En mamíferos, la 5-HT es biosintetizada en dos pasos enzimáticos. La primera de estas reacciones, y la limitante, se trata de la hidroxilación del aminoácido L-triptófano en la quinta posición del anillo indol para dar lugar a 5-hidroxitriptamina. Esta reacción, catalizada por la triptófano hidroxilasa (TPH; EC 1.14.16.4), requiere oxígeno molecular y el cofactor reductor 6-tetrahidrobiopterina (también llamada sapropterina o BH₄). Posteriormente, el 5-hidroxitriptófano es convertido a 5-HT por la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (Wang y cols., 2002; Teigen y cols., 2007). Entre sus funciones, esta amina biógena es un mediador implicado en la adhesión de mastocitos, quimiotaxis, tumorigénesis y regeneración de tejidos a través de células estromáticas (Hirota y cols., 2014). Por tanto, la 5-HT es muy importante desde un punto de vista fisiológico, debido a que ejerce sus funciones en un amplio rango de tipos celulares, neuronales, y también no neuronales, como son los mastocitos.

La presencia de 5-HT en mastocitos es un componente importante para comprender las funciones propias de este tipo celular en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y desórdenes neurodegenerativos. En los nervios periféricos, los tipos celulares asociados a la producción de 5-HT son principalmente plaquetas y mastocitos (Sommer, 2004). Asimismo, las células inmunes expresan receptores para la 5-HT (macrófagos y mastocitos de ratón) así como las células T son capaces tanto de producir 5-HT como de inducir su síntesis. Existen, por tanto, evidencias que relacionan la 5-HT con funciones del sistema inmune y la homeostasis metabólica, y no solo con aquellas relacionadas con el tejido nervioso (El-Merahbi y cols., 2015).

En cuanto a su catabolismo, la 5-HT es degradada vía monoamina oxidasa tipo A y la aldehído deshidrogenasa, dando lugar al metabolito mayoritario de esta vía, el ácido 5-hidroxi-indolacético (*5-hydroxyindoleacetic acid*, 5-HIAA) (Badawy, 2015). Asimismo, los niveles de

serotonina se ven influenciados también por la 2-3-dioxigenasa indolamina (la enzima de la degradación de L-triptófano) y por los niveles de 6-tetrahidrobiopterina (Jenkins y cols., 2016).

2.2.3. Regulación de la triptófano hidroxilasa.

La enzima clave de la biosíntesis de 5-HT es la TPH. Se han descrito dos isoformas de para esta enzima en vertebrados, TPH-1 y TPH-2. Por un lado, TPH-1 se expresa predominantemente en la periferia (especialmente en células enterocromafines del tubo digestivo) y en la glándula pineal. Asimismo, se ha descrito que TPH-1 está presente en la piel de ciertas especies como los roedores, así como en mastocitos de ratón, donde la 5-HT es producida y almacenada en sus gránulos. Algunos estudios han revelado la presencia de ARNm y de la proteína TPH-1 en mastocitos humanos, concluyendo que éstos son capaces de acumular y liberar 5-HT (Metcalf, 1984; Kushnir-Sukhov y cols., 2007 y 2008). Por otra parte, TPH-2 se expresa principalmente en cerebro y neuronas del sistema entérico (Walther y Bader, 2003; Walther y cols., 2003; Zhang y cols., 2004; Zill y cols., 2004). Ambas isoformas comparten un 71% de identidad de secuencia de aminoácidos, y difieren en su solubilidad y propiedades cinéticas (McKinney y cols., 2005).

Poco se conoce actualmente sobre la regulación de la TPH-1. Principalmente, se han descrito factores de transcripción que modulan su expresión. En células de mastocitoma P815-HTR se ha descrito que para el gen *Tph1*, la transcripción se activa por secuencias entre los nucleótidos -343 y -21. Más concretamente, existe una interacción proteína-DNA con una región invertida GGCCAAT, que es un motivo de alta afinidad para el factor NF-Y (también conocido como CP1 o CBF) (Reed y cols., 1995). Posteriormente, se describió que el factor de transcripción asociado a microftalmia (*microphthalmia-associated transcription factor*, MITF) está directamente implicado en la activación transcripcional de los genes para granzima B y *TPH-1* en mastocitos, vía activación de un motivo CANNTG (Ito y cols., 1998). A nivel de proteína, recientemente se ha descrito que derivados del ácido ursólico son capaces de inhibir la síntesis proteica de TPH-1 en células basofílicas de leucemia RBL2H3 (Fu y cols., 2015).

2.3. Interacciones de las aminas biógenas con las poliaminas

Al contrario que las PA, Hia y 5-HT son aminas biógenas presentes únicamente en un número limitado de tipos celulares, incluyendo algunas células del sistema inmune y neuronas. Sin embargo, tanto las PA como la Hia muestran un esqueleto común de 1,4-diamina, y comparten algunas similitudes en sus vías metabólicas: su biosíntesis proviene del metabolismo de aminoácidos catiónicos, el primer paso de la biosíntesis es una descarboxilación dependiente de PLP, su catabolismo podría involucrar la acción de oxidasas comunes, SAM proporciona los grupos aminopropilo y metilo en la biosíntesis de PA y el catabolismo de la Hia, respectivamente, y ambos tipos de aminas pueden unirse covalentemente a proteínas mediante la acción de las transglutaminasas (Medina y cols., 2003; Sánchez-Jiménez y cols., 2007). Todas estas evidencias hacen suponer la existencia de interferencias mutuas entre sus metabolismos (Figura 5).

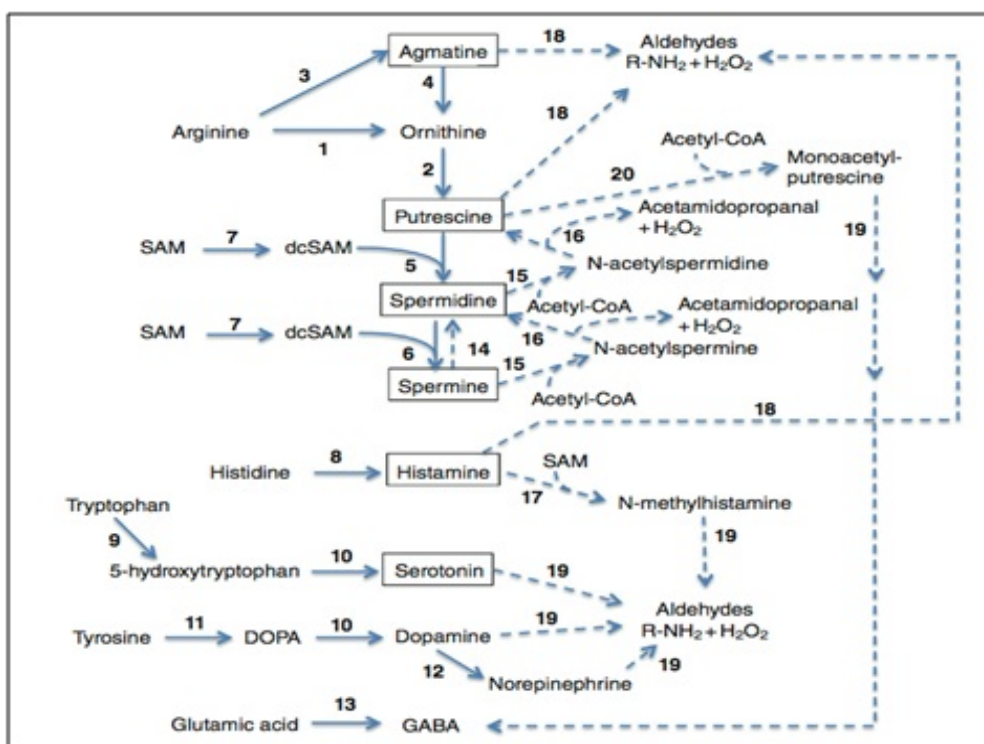


Figura 5. Interrelaciones metabólicas descritas entre las poliaminas y aminas biógenas. Las vías sintéticas están indicadas por líneas sólidas; las vías degradativas por líneas intermitentes. Tomado de Sánchez-Jiménez y cols., 2013. 1: arginasa; 2: ornitina descarboxilasa; 3: arginina descarboxilasa; 4: agmatinasa; 5: espermidina sintasa; 6: espermina sintasa; 7: S-adenosilmetionina descarboxilasa; 8: histidina descarboxilasa; 9: triptófano 5-monooxigenasa; 10: L-aminoácidos aromáticos descarboxilasa (DDC); 11: tirosina hidrolasa; 12: dopamina monooxigenasa; 13: glutamato descarboxilasa; 14: espermina oxidasa; 15: espermidina/espermina N^o-acetiltransferasa; 16: poliamina oxidasa; 17: histamina N-metil transferasa; 18: amina oxidasa; 19: aldehído deshidrogenasa.

En cuanto a la 5-HT, ya se ha descrito aquí su presencia en mastocitos de ratón y humanos (Meuer y cols., 1981; Papaliodis y cols., 2008). Debido a las numerosas evidencias de la importancia de las PA y la Hia en la fisiología de los gránulos de los mastocitos (García-Faroldi, 2009a, 2010), no es descabellado pensar que la 5-HT tenga también algún papel relevante en los mismos. Como ya se argumentó en el apartado 1.3.2, hace unos años se describió que AZIN2, una proteína que interviene en la regulación de los niveles de ODC, está presente en gránulos de mastocitos de ratón. En esos años, dada la relativamente reciente descripción de la posible existencia de diferentes subtipos de gránulos en mastocitos (Puri y Roche, 2008), AZIN2 fue asociado a un subtipo que contenía 5-HT y catepsina D como principales marcadores. En resumen, se postuló que AZIN2 podría actuar como un regulador local de la biosíntesis de PA en estos gránulos asociados a 5-HT (Kanerva y cols. 2009). Por lo descrito con anterioridad, parece que existe una interrelación entre el metabolismo de las PA y el de Hia y 5-HT, si bien aún no está bien caracterizada. Es muy posible que estas interacciones dependan del tejido y/o tipo celular del que se trate y del ambiente y los estímulos a que estén sometidos. Asimismo, esta convergencia entre metabolismos puede ser consecuencia de una compleja red de interacciones en el mastocito, siendo esta red de especial importancia para sus funciones en aquellos tejidos donde abundan mastocitos, como son la mucosa gástrica, tejido conectivo o tejidos de rápida proliferación. Debido a la experiencia previa de nuestro grupo en el uso de líneas celulares de mastocitos y mastocitos derivados de médula ósea de ratón (*bone marrow-derived mast cells*, BMMCs; Fajardo y cols., 2001a, b; García-Faroldi y cols. 2009 a y b; y 2010) así como la convergencia de los tres metabolismos en este tipo celular, éste podría ser un modelo idóneo para el estudio en profundidad de las interacciones metabólicas entre los tres elementos.

3. Mastocitos y basófilos.

3.1. Biología general del mastocito

Los mastocitos fueron descubiertos hace más de un siglo por Paul Erlich (“mastung” en alemán, bien alimentados sería su traducción) basándose en cómo algunas tinciones citoquímicas producían un cambio de coloración en los gránulos de estas células. Los mastocitos son de la progenie de células madre hematopoyéticas CD34+ (Metcalf, 2008). Estas células progenitoras circulan por la sangre antes de entrar en diversos tejidos, donde se realiza la diferenciación de las mismas a mastocitos en presencia de numerosos factores de crecimiento locales, en particular IL-3 y *Stem Cell Factor* (SCF), el cual es ligando del receptor c-kit (CD117) (Gurish, 2012).

Los mastocitos están ampliamente distribuidos por los tejidos del cuerpo humano, si bien son más abundantes en aquéllos próximos al contacto con el exterior, como son la piel y las mucosas. Debido a ello, los mastocitos están situados en primera línea de defensa contra patógenos externos y otros factores ambientales (St John, 2013). Asimismo, están implicados en la fisiopatología de los procesos alérgicos (mediante sus receptores de alta afinidad por IgE, FcεRI) al igual que en enfermedades autoinmunes (a partir de sus receptores IgG). Tradicionalmente, los mastocitos son conocidos por sus funciones en las reacciones alérgicas. Sin embargo, en los últimos años se les han atribuido otros papeles, como su contribución en las funciones y la inmunidad en el intestino (Goto y cols., 2015), así como en anafilaxis, arterioesclerosis, dermatitis, artritis y cáncer, entre otras (Modena y cols., 2016; Spinaz y cols., 2014; Nam, 2016; Cho, 2016; Ribatti, 2016).

En cuanto a su clasificación morfológica, se han descrito distintos tipos de mastocitos basados en su localización tisular. En este sentido, existen mastocitos del tejido conectivo (CTMC) y de las mucosas (MMC) en ratones. En humanos, la clasificación se realiza en base al tipo de proteasas que contienen, bien sea triptasa (MC_T) o triptasa, quimasa y carboxipeptidasa (MC_{TC}). Sin embargo, esta clasificación clásica está actualmente obsoleta, dado que parece ser que un determinante clave es la enorme variedad de factores que rodean a los mastocitos mientras que viajan al tejido diana en el proceso de diferenciación. El hecho de que los mastocitos sean influenciados por el microambiente de cada tejido sugiere que existe una enorme plétora de tipos de mastocitos en función de la región final en la que vayan a actuar (da Silva, 2014).

3.2. Gránulos de los mastocitos y el papel de las poliaminas.

La característica más importante y distintiva de los mastocitos son sus gránulos secretores. Éstos son orgánulos secretores fenotípicamente muy similares a los lisosomas, electrodensos, que ocupan la mayor proporción del citoplasma de mastocitos maduros. Los gránulos secretores están llenos de un amplio rango de mediadores y compuestos preformados (Tabla 1). Una vez que los mastocitos son activados para la desgranulación, éstos llevan a cabo la práctica totalidad de sus funciones a partir de la liberación al medio extracelular de estos compuestos, siendo por tanto los efectores de eventos fisiológicos y fisiopatológicos asociados a estas células (Wernersson y Pejler, 2014).

Tabla 1: Resumen de constituyentes, características y posibles funciones de enzimas lisosomales y aminos biógenas presentes en mastocitos humanos. Adaptado de Wernersson y Pejler, 2014.

Constituyente del gránulo	Características clave	Posible función potencial
Enzimas lisosomales		
β -hexosaminidasa	Involucrada en la interconversión de carbohidratos Usada rutinariamente como marcador de la desgranulación en mastocitos	Probable papel en el proceso de degradación de los lisosomas
β -glucuronidasa, N-acetil β -glucosaminidasa, β -galactosidasa	Involucrada en la interconversión de carbohidratos	Probable papel en el proceso de degradación de los lisosomas Procesamiento pro-triptasa
Catepsina B	Cisteín-proteasa	Probable papel en el proceso de degradación de los lisosomas Crucial en el procesamiento pro-quimasa
Catepsina C	Cisteín-proteasa	Probable papel en el proceso de degradación de los lisosomas Procesamiento pro-triptasa
Catepsina L	Cisteín-proteasa	Probable papel en el proceso de degradación de los lisosomas Función desconocida en mastocitos
Catepsina D	Proteasa de ácido aspártico	Probable papel en el proceso de degradación de los lisosomas Papel en el procesamiento de pro-CPA3
Catepsina E	Proteasa de ácido aspártico	Probable papel en el proceso de degradación de los lisosomas
Aminas biógenas		
Histamina	Presente en todos los subtipos de mastocitos en todas las especies	Induce broncoconstricción, vasodilatación y permeabilidad vascular. Papel potencial en la señalización de mastocitos a las terminaciones nerviosas.
Serotonina	Niveles altos en mastocitos de ratón Niveles bajos en mastocitos humanos	Neurotransmisor Papel potencial en la señalización de mastocitos a las terminaciones nerviosas
Dopamina	Niveles bajos No encontrado en mastocitos humanos	Neurotransmisor Papel potencial en la señalización de mastocitos a las terminaciones nerviosas
Poliaminas	Componentes ubicuos de células de mamíferos	Regulación de ultraestructura de los gránulos y del almacenamiento de histamina, serotonina y β -hexosaminidasa

Cabe destacar que muchos de los mediadores de los gránulos están formados previamente, si bien la activación de los mastocitos puede provocar la síntesis *de novo* de muchos compuestos bioactivos, incluyendo mediadores lipídicos (leucotrienos C4, prostaglandinas D2 y factor activador de plaquetas) al igual que citoquinas y quimioquinas (Metcalf, 2007; Moon y cols., 2014). Entre los factores destacados en los gránulos de los mastocitos podemos encontrar las aminas biógenas. A pesar de la más que conocida presencia de Hia en el interior de los gránulos, existen evidencias de la presencia de otras aminas biógenas, como 5-HT y las PA, siendo esta convergencia de especial interés en el presente trabajo.

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación hemos constatado la presencia de PA, Hia y 5-HT en los gránulos de BMMC's (García-Faroldi y cols., 2010). Mediante el uso de un compuesto químico, el α -difluoromethylornithine (DFMO), un inhibidor suicida de la ODC, se describió que los gránulos secretores presentaban una ultraestructura aberrante, además de que estaba impedido el almacenamiento de Hia, que los niveles de 5-HT estaban disminuidos, y que se incrementó el contenido de β -hexosaminidasa. En conjunto, este trabajo demostró que las PA poseen un papel esencial durante la biogénesis y homeostasis de los gránulos de los BMMC's. Dado este y otros antecedentes, se requiere un estudio más en profundidad de los posibles mecanismos que interrelacionan a las aminas biógenas en este sistema.

3.3 Modelos celulares para el estudio de mastocitos

En humanos, los mastocitos están ampliamente distribuidos en varios órganos y tejidos, siendo particularmente abundantes en sitios de interacción con el medio externo, como la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal. Sin embargo, estos apenas conforman el 1% del total respecto a otras células inmunes (Cardamone y cols., 2016). Asimismo, debido a que los mastocitos se encuentran diferenciados en los tejidos, es muy difícil aislarlos de los organismos de origen y obtener importantes cantidades de los mismos, ya sea para experimentos *in vitro* (estudios de sensibilización y señalización celular) como *in vivo* (Meurer y cols., 2016).

A pesar de estas limitaciones, se han utilizado mastocitos humanos primarios, aunque existen pocos sistemas de cultivo celular que permitan, tras una compleja purificación, el mantenimiento e incluso el crecimiento limitado de estas células. Principalmente, los estudios en este campo se han realizado con progenitores hematopoyéticos humanos (hHP), derivados de cordón umbilical (CB) o de sangre periférica (PB). En ambos casos, sería necesario un millón de células hHP para dar lugar a entre 7 y 10 millones de células derivadas de CB o PB, respectivamente, estimando su pureza en un 95%. (Arock y cols., 2008). Mientras que aquellas células derivadas de CB son relativamente inmaduras y no expresan el receptor Fc ϵ RI, las derivadas de PB son relativamente maduras, llegando a expresar triptasa, quimasa y Fc ϵ RI (Arock, 2016). No obstante, la duración del proceso de maduración (8-10 semanas) y la dificultad de poner a punto este proceso han los principales obstáculos para su utilización.

Debido a estas limitaciones, se han desarrollado líneas celulares inmortalizadas de mastocitos (L138.8A, HMC-1). Estas líneas celulares presentan la ventaja de que pueden crecer de manera independiente de citoquinas (IL-3, SCF, etc), siendo herramientas muy útiles para experimentos que requieran un alto número de células. Sin embargo, los resultados han de interpretarse con cautela, dado que presentan mutaciones en componentes clave de señalización celular, perdiendo en muchos casos el fenotipo (Csaba, 2015). Por ejemplo, algunas no presentan el receptor Fc ϵ RI, por lo que no tienen la posibilidad de desgranular mediante estimulación con IgE. Esto supone no disponer de una herramienta muy importante en estudio de la fisiología del mastocito. No obstante, existen otras líneas celulares de mastocitos, como la línea celular de mastocitos humanos LAD2, obtenida a partir de la médula

ósea de un paciente con sarcoma/leucemia de mastocitos (Kirshenbaum y cols., 2003). Esta línea celular expresa FcεRI, CD4, 9, 13, 14, 22, 31, 32, 45, 64, 71, 103, 117, 132, CXCR4 (CD184), CCR5 (CD195), así como H1a, triptasa y quimasa. Además, liberan β-hexosaminidasa tras la agregación de FcεRI o FcγRI. Por todo ello, constituyen un modelo muy completo de mastocitos humanos con el que poder trabajar.

Por otro lado, se ha producido un aumento en el número de trabajos científicos que, en lugar de líneas celulares, utilizan BMMCs (Malbec y cols., 2007). Estos BMMCs han sido considerados por muchos autores como el equivalente más próximo a mastocitos tipo mucosa o MMC de ratón. Los BMMCs expresan FcεRI, FcRIIIA y FcRIIB, y liberan los mediadores almacenados en los gránulos mediante estimulación con IgE, siendo ampliamente utilizados para estudiar el proceso de desgranulación (Benhamou y cols., 1990; Garcia-Faroldi y cols., 2009b). Asimismo, estos estudios han permitido analizar una enorme variedad de componentes presentes en los gránulos, así como las funciones que estos ejercen (Wernersson y Pejler, 2014).

3.4. Basófilos humanos

Los basófilos son el tipo celular menos abundante de la serie granulocítica, representando identificados por primera vez también por Paul Ehrlich (Ehrlich, 1878). Los basófilos constituyen menos de un 1% de la población leucocitaria periférica, siendo inicialmente poco estudiados debido a su abundancia minoritaria. Sin embargo, debido a sus características similares a los mastocitos residentes en tejidos, y a su accesibilidad en sangre periférica, los basófilos han sido una herramienta muy importante para caracterizar las funciones de los mastocitos (Crivellato y cols., 2011; Siracusa y cols., 2013). A principios de la década de 1980, los basófilos fueron identificados en ratones, y una década después, se utilizaron en estudios con ratones modificados genéticamente. Como resultado, se describió que los basófilos tienen un papel crítico en los procesos autoinmunes, inflamatorios y en la patogénesis de numerosas enfermedades (Sullivan y cols., 2011; Karasuyama y Yamanishi, 2014).

Los basófilos, al igual que los mastocitos, derivan de células madre hematopoyéticas que residen en la médula ósea. A diferencia de éstos, no la abandonan sin completar su diferenciación, ya que cuando entran al torrente circulatorio lo hacen como células complemente maduras (Voehringer, 2013). Los basófilos son definidos, mediante sus marcadores principales, como células de linaje negativo (Lin⁻) CD34⁺, c-Kit⁺ (CD117). Asimismo, se han identificado dos poblaciones distintas de basófilos: (i) clásicos, estimulados por IL-3 que se activan eficientemente mediante mecanismos IgE dependientes, y (ii) basófilos linfopoyéticos del timo, IgE independientes (Siracusa y cols., 2011). Estas diferencias derivan de los precursores granulocito-monocito (GMP), unas células presentes tanto en el timo como en la médula ósea, existiendo dos subtipos de las mismas en ambos tejidos. En el caso de las GMP presentes en timo, éstas presentan, además de los marcadores mencionados anteriormente, una elevada expresión de los genes *Runx1* y *C/EBPα*. Adicionalmente, estudios *in vitro* han demostrado que estas GMP del timo dan lugar a un mayor número de basófilos en comparación a las GMP de la médula ósea (Siracusa y cols., 2013). Ciertamente, aunque son muchos los factores que puedan llevar a la expresión de determinadas moléculas en los basófilos, ciertas citoquinas parecen guiar hacia fenotipos funcionales diferentes. Por ejemplo, la linfopoyetina tímica estromal (TSLP) ha mostrado mediar el reclutamiento de estas células a la piel en dermatitis atópica (Siracusa y cols., 2011), mientras que la IL-3 promueve su reclutamiento hacia ganglios linfáticos (Kim y cols., 2010).

El mecanismo más estudiado de activación de los basófilos es el de la estimulación mediante IgE de los receptores de alta afinidad FcεRI (Kraft y Kinet, 2007). En respuesta a la

activación por IgE, los basófilos desgranulan rápidamente una gran variedad de moléculas efectoras, como Hia, IL-4, IL-13, leucotrienos y factor activador de plaquetas (Broide, 2001; Otsuka y cols., 2016). Aunque FcεRI es el principal receptor Fc en basófilos, estos pueden activarse o inhibirse mediante otros receptores Fc, esto es FcγRIIA y FcγRIIB, respectivamente (Cassard y cols., 2012). Estos receptores activan quinasas intracelulares de la familia Src, como son Lyn, Fyn y Syk, para inducir una serie de cambios celulares (Bruhns y Johnson, 2015). Por todo ello, los basófilos humanos, al igual que los mastocitos, constituyen una importante herramienta para el estudio de los procesos de desgranulación y la fisiología de la serie granulocítica-monocítica, y por tanto, de todos aquellos procesos inmunológicos en los que ambos tipos celulares están implicados.

De manera resumida, los basófilos presentan la ventaja frente a los mastocitos de que este tipo celular llega ya maduro a la sangre periférica, no siendo necesario realizar cultivos ni proceso madurativo. Esto es sumamente importante, dado que una vez purificados los basófilos, pueden ser utilizados directamente en los experimentos requeridos en tampón salino. Por otra parte, ambos pertenecen al linaje granulocítico-monocítico, y provienen de los mismos precursores (GMP), compartiendo muchas características fenotípicas, como la acumulación y liberación del contenido de los gránulos tras ser estimulados con IgE (Knol y Gibbs, 2014; Gibbs y Falcone, 2014). Por último, aunque se ha descrito que las PA están presentes en prácticamente todos los organismos vivos, es llamativo el hecho de que no haya nada publicado hasta la fecha acerca de las PA y basófilos, ni de ratón ni humanos. Por tanto, es una vía de investigación nueva abierta a futuros experimentos.

3.5. Interrelación de aminas biógenas y poliaminas en mastocitos y basófilos

Tal y como se mencionó en el apartado 2.3, existe una convergencia entre metabolismos de las aminas biógenas. Ya en la década de 1980, Bartholeins y Bouclier describieron una regulación coordinada para HDC y ODC en varios tipos celulares (Bartholeins y Bouclier, 1984). Asimismo, pudiera ser que las aminas biógenas formen una red de interacciones en tipos celulares como el mastocito, donde coexisten los metabolismos de PA, Hia y 5-HT, siendo de especial importancia para sus funciones aquellos tejidos donde abundan mastocitos, como son la mucosa gástrica, tejido conectivo o tejidos de rápida proliferación.

En nuestro grupo de investigación ya se comenzaron a investigar estas relaciones en células del tumor ascítico de Ehrlich (EATC). En estas células se observó que al incubar con Hia se inhibía el transporte de ornitina. Asimismo, al incubar con Hia y/o 1,4-diaminas, se evitaba la unión de ornitina a la ODC. Por último, al usar clorfeniramina se inhibía la traducción del ARNm de la ODC (Medina, 2001; Matés y cols., 1991; Urdiales y cols., 1992). Por otra parte, se trataron con un éster de forbol y dexametasona células de la línea de mastocitos C57.1, y se observó un aumento de actividad HDC y de los niveles de Hia, en un claro antagonismo con los niveles de PA y de ODC, así como una reducción de la proliferación (Fajardo y cols., 2001b). En estas mismas células, al tratarlas con Hia 500 μM, se inhibía el transporte de PA, se estimulaba la SSAT, con la consecuente reducción de los niveles de PA (Fajardo y cols., 2001a). Posteriormente, durante los últimos años, nuestro grupo de investigación ha trabajado con BMMCs. En este tipo celular se ha demostrado que las PA afectan a la síntesis de Hia durante las etapas tempranas de diferenciación de los BMMCs utilizando IL-3 (García-Faroldi y cols., 2009a). Asimismo, se observó que las PA están presentes en los gránulos secretorios de mastocitos, siendo importantes para el almacenamiento de Hia y los niveles de 5-HT (García-Faroldi y cols. 2010). Por otro lado, en 2009 se describió que AZIN2 está presente en mastocitos, y los autores propusieron que podía actuar como un regulador local de la biosíntesis de PA en asociación con gránulos que contenían 5-HT (Kanerva y cols., 2009).

En los últimos años, el grupo de investigación del Dr. Rafael Peñafiel (Universidad de Murcia) ha realizado importantes progresos en el papel de AZIN2 trabajando con un modelo de ratón transgénico hipomórfico para el gen *Azin2* (Lopez-García y cols., 2013). De manera resumida, estos ratones poseen una versión truncada del gen *Azin2* fusionado con el gen bacteriano *lacZ* (codificante para β -D-galactosidasa) bajo el control del promotor natural de *Azin2*. De esta forma, en lugar del producto génico correspondiente a *Azin2*, estos animales expresan una proteína recombinante que consiste en una versión truncada inactiva de AZIN2 (contiene los primeros 92 aminoácidos) fusionada con la β -D-galactosidasa (Figura 6). Esta estrategia preserva la expresión natural del gen, aunque el producto génico es inactivo y fácilmente detectable mediante el reportero β -D-galactosidasa, siendo una herramienta muy útil para investigar el posible papel de AZIN2 en el metabolismo de aminas biógenas.

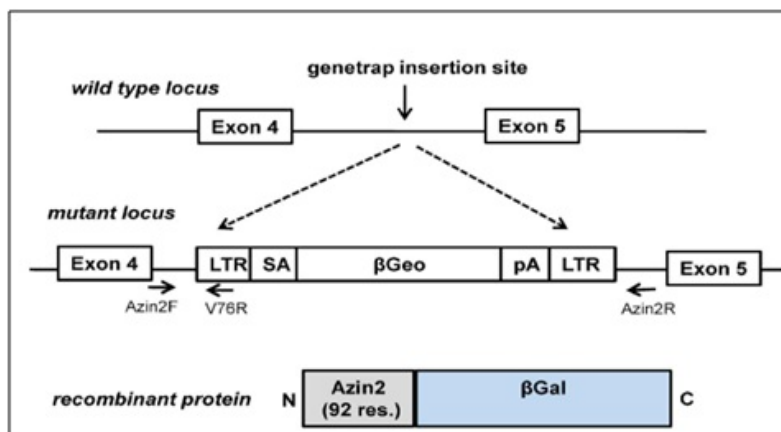


Figura 6. Esquema de la técnica utilizada para la generación de ratones hipomórficos para el gen *Azin2* mediante mutagénesis de trampa génica. Inserción entre los exones codificantes 4 y 5. El producto proteico recombinante conserva los 92 primeros aminoácidos desde el amino terminal del gen *Azin2* nativo. Tomado de López-García y cols., 2012.

Por último, ya se ha mencionado la relación entre los niveles de Hia y la sobreexpresión de SSAT, que daba lugar a una disminución de los niveles de PA en la línea celular de mastocitos C57.1 (Fajardo y cols., 2001a). Como se mencionó en el apartado 1.3.3, la SSAT es la enzima clave en la regulación del catabolismo de las PA. Además, se han descrito algunos compuestos que inducen la sobreexpresión de SSAT, como son DENSp_m y resveratrol (Tian y cols., 2012; Wolter y cols., 2003). Es esperable que estos tratamientos puedan provocar una disminución importante en los niveles de PA, siendo interesante estudiar como una variación de niveles de SSAT podría dar pistas acerca de la interrelación de aminas biógenas.

4. Membranas celulares

4.1. Aspectos biológicos y biofísicos

Fue a finales del siglo XIX cuando Overton concluyó, a partir de sus mediciones de permeabilidad celular, que las membranas eran estructuras compuestas esencialmente por lípidos (Overton, 1895). Algunos años después, se descubrió que existía una cantidad de lípidos en la membrana del eritrocito para cubrir exactamente 2 veces la superficie celular (Gortel y Grendel, 1925). Por tanto, al menos en el eritrocito, su membrana se debía de corresponder con una bicapa lipídica. Una década después, se determinó que el elemento básico estructural de las biomembranas correspondía con los fosfolípidos (Davson y Danielli, 1936). Todos estos modelos tuvieron su influencia sobre la visión que tenemos de la estructura y dinámica de las membranas celulares, que finalmente se definió como “mosaico fluido” y que es aceptado en nuestros días.

Las biomembranas son barreras selectivas semipermeables que consisten en una bicapa fluida de fosfolípidos y proteínas, carbohidratos y los complejos que forman (Singer y Nicolson, 1972). Las membranas son a menudo consideradas simplemente como una barrera que separa dos “compartimentos” de distinta composición. No obstante, muchos de los procesos bioquímicos de una célula se producen en las membranas o ligadas a ellas. Es por esto que las membranas cumplen muchísimas funciones clave en la viabilidad celular, entre las que destacan señalización celular, adhesión, diferenciación, apoptosis, así como la compartimentación y funcionalidad de los diferentes orgánulos subcelulares (Goñi, 2014).

Asimismo, el modelo de “mosaico fluido” ha ido evolucionando con el avance de las investigaciones, y adquiriendo nuevas características. El carácter anfipático de los fosfolípidos lleva a la asociación de las cabezas polares entre sí y, análogamente, a una asociación entre las colas hidrofóbicas, de manera que cabría esperar que existiera una simetría de ambas hemimembranas. Sin embargo, es un hecho que las biomembranas son asimétricas, e incluso variaciones en esta asimetría están muy a menudo relacionadas con ciertas patologías (Fadeel y Xue, 2009). Por otro lado, si bien Singer y Nicolson determinaron que existían proteínas insertas en la membrana, consideraron que estas representaban un pequeño porcentaje. Sin embargo, actualmente se ha podido comprobar que existe una alta densidad de proteínas que están ligadas o atraviesan la bicapa lipídica, representando en algunos casos hasta el 50% de la composición total de la membrana (Engelman, 2005).

En cuanto a sus características biofísicas, mientras que la fase líquido-cristalina de la bicapa ha sido considerada fisiológicamente relevante, en los últimos años parece ser que otros estadios de la membrana, como fase líquida ordenada y fase cúbica también juegan papeles muy importantes para la fisiología celular (Demurtas y cols., 2015; Zhendre y cols., 2011). Cabe añadir que se creía que el movimiento de lípidos entre membranas (con ayuda de flippasa o escramblasa en un mecanismo aún no caracterizado) no se producía excepto en la biosíntesis, sin embargo, se ha demostrado que pueden ocurrir en otras circunstancias, como en procesos de apoptosis (Goñi, 2014). Todos estos elementos nos demuestran que el modelo actual queda bastante lejos de la consideración del tipo de membrana que imaginaron Singer y Nicolson.

Históricamente, el estudio de las propiedades y las interacciones de las biomembranas se ha basado en dos aproximaciones experimentales. En primer lugar, el modelo clásico de *black lipid membranes* (BLM) descrito por primera vez por Mueller (Mueller y col., 1962). En segundo lugar, el modelo de liposomas propuesto por Banbham y Horne (Banbham y Horne, 1964).

En el primer modelo se caracterizaron por vez primera las propiedades fisicoquímicas de las membranas. Los lípidos fueron extraídos de fuentes naturales, y formaron “parches” lipídicos de 6-9 nm de ancho y 10 nm² de superficie sobre una capa de teflón. Para su observación al microscopio electrónico, estos parches fueron recubiertos de tetraóxido de osmio, de ahí su denominación de “black”. Este sistema modelo muestra una razonable similitud con las membranas celulares porque permite el control simultáneo de las soluciones y el balance eléctrico a ambos lados de la bicapa, siendo muy útil a la hora de mimetizar muchas condiciones fisiológicas (Micelli y cols., 2000).

El segundo modelo de membrana utilizado es el de vesículas lipídicas o liposomas. Son estructuras esféricas de bicapa lipídica encerrando una solución acuosa. Estos se forman cuando usamos lípidos (comúnmente, fosfolípidos) cuya forma molecular se asemeja mucho a la de un cilindro, permitiendo que al exponerse a una solución acuosa, se formen los liposomas de manera espontánea. Se pueden preparar diferentes tipos de liposomas, variando en su tamaño y número de capas, siendo su preparación ampliamente descrita más adelante en el apartado Material y Métodos: Técnicas Biofísicas. Cabe destacar la simplicidad y reproducibilidad de este método, lo que nos proporciona una herramienta para estudiar numerosas interacciones y procesos biofísicos en biomembranas, tales como fusión, fisión, solubilización, agregación, interacción con proteínas e incluso intercambio de líquidos entre compartimentos (Lete y cols., 2014, 2015). Por todo ello, supone un modelo muy atractivo a la hora de estudiar posibles interacciones con PA y con otros elementos aniónicos.

4.2 Poliaminas en el mundo prebiótico

Muchas de las funciones y características descritas en el apartado 1 de esta introducción para las PA derivan de la particularidad de su estructura molecular. Esta estructura es relativamente simple, pero muy especial, dado que las cargas positivas de los átomos de nitrógeno se encuentran distribuidas a lo largo de la cadena carbonada flexible, lo cual posibilita las interacciones con biomoléculas cargadas negativamente, como ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos (Orberg y cols., 2007). Así, en el núcleo celular se cree que participan en el empaquetamiento del material genético y que aseguran la fidelidad de la transcripción del ADN, mientras que en el citosol modulan la síntesis proteica (Igarashi y Kashiwagi, 2015).

Anteriormente se ha mencionado la importancia de las PA y su presencia en prácticamente la totalidad de los seres vivos. Sin embargo, en los últimos años ha ganado interés la posibilidad de que las PA estuviesen incluso antes del propio origen de la vida. En base a esto, cabe destacar que algunos autores han conseguido identificar precursores de PA en algunos meteoritos, entre ellos el famoso Meteorito de Murchinson (Meierhenrich y cols., 2004). De manera más concreta, los compuestos ácido 2,3-diaminopropanoico, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 4,4'-diaminoisopentanoico, ácido 3,3'-diaminoisobutanoico y ácido 2,3-diaminobutanoico han sido identificados en extractos de condritos de este meteorito (Burton y cols., 2012) corroborando que es muy posible que las PA estuviesen presentes en un ambiente prebiótico.

Asimismo, recientemente se ha mencionado a las PA y su posible implicación en procesos moleculares clave en un ambiente prebiótico primitivo. En una elegante y reciente publicación, las PA han sido propuestas como una de las Moléculas e Iones Simples Universales (*Simple Universal Molecules and Ions*, SUMIs). Este grupo lo forman moléculas e iones universales que originalmente tuvieron un papel relevante para dar lugar a la primeras protocelulas. Las PA, por tanto, han sido propuestas para numerosos papeles clave en este proceso, tales como ser fuente de nitrógeno o bien colaborar como estructuras policatiónicas estabilizadoras de otras macromoléculas (Norris y cols., 2014).

Es importante mencionar que no sólo las PA sino también sus posibles interactores podrían haber estado presentes en el mundo prebiótico, llevando a cabo algunos procesos moleculares importantes. Las teorías del origen de la vida afirman que es muy factible que los aminoácidos ya estuviesen presentes, así como otras biomoléculas similares a los nucleótidos. En este sentido, la descarboxilación de aminoácidos para producir aminas suele ser un proceso dependiente de compuestos similares a nucleótidos, como es el piridoxal-5'-fosfato (PLP). Este cofactor es capaz de reaccionar con aminas incluso en ausencia de proteínas (Cordes y Jencks, 1962). La dependencia de PLP está particularmente extendida en el metabolismo del nitrógeno en todos los organismos vivos, pues es cofactor de numerosas enzimas como sintetas, liasas, racemasas, descarboxilasas y transferasas (Schneider y cols., 2000). Esto parece sugerir que éste compuesto orgánico y las aminas derivadas de aminoácidos podrían estar en el origen del metabolismo del nitrógeno.

En cuanto a estructuras membranosas prebióticas, se han sugerido diferentes modelos. En los últimos años, se ha demostrado experimentalmente que es posible que cadenas alifáticas oxidadas, como son alcoholes alifáticos y ácidos grasos, serían capaces de formar vesículas lipídicas similares a las que pudieron estar presentes en la era prebiótica (Rendón y cols., 2012). Además, cabe destacar que la idea de un “mundo ARN”, esto es, un mundo primitivo donde las interacciones estaban mediadas por ARN autoreplicantes similares a ribozimas, está actualmente aceptada por la mayoría de la comunidad científica (Ruiz-Mirazo y cols., 2014).

En términos generales, se acepta la hipótesis de que, en el origen de la vida y bajo condiciones azarosas pero favorables termodinámicamente, estas moléculas de ARN autocatalíticas y/o autoreplicantes quedaron encerradas en estructuras membranosas, proporcionándoles una ventaja evolutiva y dando lugar al último antecesor común universal (*Last Common Universal Ancestor*, LUCA) (Penny y Poole, 1999; Forterre, 2015). Sin embargo, existen algunos interrogantes en este proceso primigenio que arrojan serias dudas acerca de la viabilidad del mismo. En principio, se cree que este proceso tuvo lugar ayudado en su mayoría por interacciones electrostáticas entre los elementos. No obstante, tanto ácidos nucleicos como ácidos grasos es muy probable que estuviesen cargados negativamente en un ambiente primitivo, y por tanto, las interacciones electrostáticas serían, en este caso, de repulsión. Debido a ello, ¿cómo es posible que una estructura como una protocelula pudiera formarse si no estaba favorecida por interacciones electrostáticas? ¿Existe la posibilidad de que algún tipo de molécula catiónica ayudase y/o tuviese un papel relevante en este proceso? Estas son preguntas importantes sobre el origen de LUCA que aún no han sido resueltas.

4.3. Interacciones de las membranas biológicas con las poliaminas

A lo largo del siglo XX, las PA se han relacionado siempre con ácidos nucleicos presentes en células vivas debido al carácter polianiónico de éstos. Sin embargo, se ha prestado poca atención a sus interacciones con otro elemento electronegativo de gran importancia: las membranas biológicas. Desde finales del siglo pasado, se han realizado pocos estudios que relacionen las vesículas lipídicas y las PA. En esta línea, se han descrito interacciones con vesículas formadas principalmente de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidil colina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol, usando un amplio rango de condiciones experimentales (Schuber y cols., 1983; Tadolini y Varani, 1986; Cohen, 1998). Recientemente, se han descrito importantes avances en las interacciones biofísicas entre las PA y las vesículas lipídicas (Finger y cols., 2014). Sin embargo, estas interacciones y su importancia funcional configuran aún un área oscura de la biología celular y molecular, especialmente en animales donde el transportador específico de PA aún no ha sido descrito (Abdulhussein y Wallace, 2014), a pesar de que varios modelos de transporte hayan sido propuestos (Poulin y cols, 2012), tal y como se mencionó en el apartado 1.2.3.

En los últimos años se ha descrito que la proteína AZ1 de *Saccharomyces cerevisiae*, asociada a su membrana plasmática, es capaz de unir covalentemente PA, sugiriendo que posee un papel importante como sensor de PA (Kurian y cols., 2011). Además, como se mencionó anteriormente, existen evidencias de que AZIN2, un elemento relacionado con la regulación de los niveles de PA, está presente en los gránulos de mastocitos (Kanerva y cols., 2009) así como los niveles de PA son esenciales para un proceso normal de biogénesis de los gránulos de BMMCs (García-Faroldi y cols., 2010).

De manera más práctica, el avance en la caracterización de estas interacciones moleculares entre PA y membranas biológicas puede suponer un impulso para numerosos campos de investigación científicos y biotecnológicos; por ejemplo, en la regulación inflamatoria o neuroendocrina (Kanerva y cols., 2009), mecanismos de señalización modulados por PA (Coburn, 2009), incluyendo aquellos relacionados con la progresión del cáncer (Gilmour, 2007; Ruiz-Pérez y cols., 2015), así como el desarrollo de terapias basadas en PA (Chen y cols., 2006). Por todo lo descrito en este apartado, existen evidencias de que las PA y sus elementos relacionados juegan un papel importante como moduladores de la estructura y/o dinámica de membranas.

4.4. Interacciones entre ácidos nucleicos y poliaminas

Otros de los elementos electronegativos cuya interacción va ligada a la importancia de las PA para la supervivencia son los ácidos nucleicos. Las PA son capaces de inducir cambios conformacionales en el ADN y ARN, siendo importantes en la transcripción y también en la traducción y síntesis proteica (Igarashi y Kashiwagi, 2015). Además, cabe destacar que la Spd es también un precursor de la hipusina, un activador covalente del factor eIF-5A (Kaiser, 2012).

En los últimos 20 años se han realizado múltiples trabajos biofísicos para determinar las conformaciones más probables de la Spd y Spm a la hora de interactuar con el ADN genómico y otros fragmentos de ADN de diferentes longitud y secuencia (Basu y cols., 1996; Cohen, 1998; Ruiz-Chica y cols., 2001 y 2003). De manera resumida, podemos afirmar que las PA son capaces de estabilizar la doble hebra de ADN, siendo capaces de inducir transiciones de conformación B a Z, e incluso formando fases colestéricas en aquellas secuencias enriquecidas en GC (Ruiz-Chica y cols., 2001). Recientemente, se ha publicado una interesante revisión de los estudios biofísicos realizados acerca de las interacciones entre las PA y el ARN, así como sus consecuencias funcionales más directas (Lighfoot y Hall, 2014).

4.5. Liposomas, poliaminas y ácidos nucleicos: un tripartito inédito

Adoptando un punto de vista global de lo descrito en esta introducción, existen numerosas evidencias que llevan a pensar que las PA y elementos de su metabolismo y/o regulación pueden tener un papel clave a la hora de interactuar con las membranas biológicas, en particular con estructuras como son los gránulos de los mastocitos. Anteriormente nuestro grupo de investigación publicó que la depleción de PA mediante el uso de DFMO producía una ultraestructura aberrante en gránulos secretores de BMMCs (García-Faroldi y cols., 2010). Una estructura que potencialmente puede interactuar con las PA son los proteoglicanos (PG). De hecho, se ha descrito una fuerte interacción entre la Spm con PG que contienen glucosaminoglucanos del tipo heparán sulfato/heparina (Belting y cols., 1996). Además, la incorporación de PA desde el medio extracelular depende de su interacción con PG de heparán sulfato de superficie (Belting y cols., 2002), y se ha demostrado que el glipican-1 es un tipo importante de PG que media en el transporte de PA en mamíferos (Belting y cols., 2003).

Por todo ello, se puede hipotetizar que en los gránulos podrían existir interacciones clave entre elementos polianiónicos (PG de serglicina y membranas biológicas) y las PA (policationes alifáticos) siendo este tripartito uno de los responsables de la estabilidad de los

mismos. Sin embargo, el estudio molecular de dichas interacciones entre 3 elementos parece difícilmente abordable en este modelo, si bien, dentro del gránulo del mastocito, estos elementos conviven con muchísimos otros componentes que pueden complicar el análisis de dichas interacciones. Sin embargo, podrían estudiarse en profundidad las interacciones biofísicas de estos elementos en un sistema más sencillo, como son los liposomas.

El grupo de investigación del Dr. Felix Goñi, de la Unidad de Biofísica de la Universidad del País Vasco, se reconoce internacionalmente como experto en la síntesis, caracterización y estudio de liposomas y sus interacciones con otros elementos (Goñi y cols., 2003). Recientemente, este grupo ha demostrado que son una herramienta muy útil como modelo de trabajo reproducible y bien caracterizado para el estudio de interacciones biofísicas entre elementos polianiónicos y policationicos, como las histonas (Lete y cols., 2014 y 2015). Por tanto, se decidió utilizar este sistema, además de PA y ácidos nucleicos, para determinar si es posible que este tripartito se formara en condiciones prebióticas. En resumen, el análisis de las interacciones electrostáticas de las PA podría suponer un importante avance en el conocimiento de: (i) las interacciones electrostáticas que pudieron favorecer la formación de una estructura parecida a LUCA, y (ii) el posible papel de las PA en la dinámica de membranas, siendo este muy importante en estructuras membranosas fisiológicamente importantes, como en este caso, los gránulos de los mastocitos.

Hipótesis y objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Planteamiento general

El estudio de la interacción entre las poliaminas con diversos elementos de su entorno para comprender sus funciones fisiológicas constituye uno de los principales retos de nuestro grupo de investigación.

Por un lado, existen numerosas evidencias que apuntan a la importancia de las poliaminas y elementos de su metabolismo en relación con las membranas biológicas. Un buen ejemplo de ello podrían ser mastocitos y basófilos, y más concretamente, los procesos que ocurren asociados a sus gránulos secretores. Por otro lado, si bien las interacciones de las poliaminas con membranas y ácidos nucleicos se han estudiado con anterioridad, no se ha investigado la concurrencia de varios de estos elementos en un sistema complejo, ni las interacciones de las poliaminas en su conjunto.

Por tanto, en base a lo expuesto anteriormente, y con el objeto de continuar con estas líneas de trabajo, se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos para la presente Tesis Doctoral:

Hipótesis 1

Las poliaminas y elementos de su metabolismo tienen un papel relevante en la regulación de la fisiología de mastocitos y basófilos, en asociación con las estructuras de membrana como son los gránulos secretores.

Hipótesis 2

El estudio de las interacciones biofísicas y moleculares entre las poliaminas y elementos de membrana, junto con otros elementos electronegativos, podría ser clave para el entendimiento de las funciones de las poliaminas en sistemas biológicos complejos.

Para comprobar estas hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo 1

1.1. Estudiar el papel de AZIN2, un elemento regulador del metabolismo de las poliaminas, en la fisiología de los gránulos secretores de mastocitos derivados de la médula ósea de ratón.

1.2. Estudiar el papel de las poliaminas, mediante la sobreexpresión inducida de SSAT, en la fisiología de los gránulos de mastocitos y basófilos humanos.

Objetivo 2

Estudiar las interacciones biofísicas de las poliaminas en relación con membranas biológicas y ácidos nucleicos en su conjunto.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hypothesis and aims



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

General aim

One of the main challenges of our research group is to study the interactions of polyamines with different surrounding elements to improve the knowledge about polyamines physiological functions.

On the one hand, there are many evidences indicating the importance of polyamines and polyamine-related elements in relation to biological membranes. A good example is constituted by mast cells and basophils, particularly the molecular processes associated with their secretory granules. On the other hand, in spite of previous studies regarding polyamine interactions with biological membranes and nucleic acid, it still remains elusive the research about the interactions of polyamines in concurrence with several different elements as a whole.

Therefore, with the purpose of continuing with this line of research, the following hypothesis and aims were proposed for the present Doctoral Thesis:

Hypothesis 1

Polyamines and polyamine-related elements have a key role in the physiological regulation of mast cells and basophils, in association with the membrane-based structures that are the secretory granules.

Hypothesis 2

To study the biophysical and molecular interactions among polyamines and membrane elements, together with other electronegatively charged elements, might be of key importance to understand the functions of polyamines in complex biological systems.

In order to address these hypotheses the following objectives were proposed:

Objective 1

1.1. To study the role of AZIN2, a polyamine metabolism regulator element, in the physiology of the secretory granules of mouse bone marrow derived mast cells.

1.2. To study the role of polyamines, by means of induced overexpression of SSAT, in the physiology of the secretory granules of human mast cells and basophils.

Objective 2

To investigate the biophysical interactions of polyamines in relation to biological membranes and nucleic acids as a whole.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Material y Métodos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Material y productos empleados

Las sales y otros productos utilizados en la preparación de soluciones y tampones fueron de diversas casas comerciales, principalmente por Merck (VWR International, EE.UU.) o Sigma-Aldrich (EE.UU.). Otros compuestos usados para distintos propósitos fueron de Fluka, como son el cloruro de dansilo (DaCl) y el 1,8-diaminooctano (1,8-DO). Asimismo, el 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamínido (NAG) fue proporcionado por Sigma. El compuesto N1,N11-dietilnoespermina (DENSpM) fue amablemente cedidos por el Dr. Patrick Woster (*Wayne State University*, EE.UU.). Los solventes orgánicos usados fueron de Merck (VWR International, EE.UU.) y aquellos utilizados para los experimentos de HPLC fueron de Romil (Reino Unido). El bromuro de etidio fue de *Boehringer Ingelheim* (España).

Los aminoácidos marcados L-[U- 14 C]-histidina (50 μ Ci/mL, >300 mCi/mmol) y L-[1- 14 C]-ornitina (100 μ Ci/mL, 57.1 mCi/mmol), usados para los ensayos de actividad histidina decarboxilasa y ornitina decarboxilasa, respectivamente, fueron suministrados por GE Healthcare (España).

Los medios de cultivo y el suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS) fueron suministrados por Gibco (Thermo Fisher Scientific). Los antibióticos y el aminoácido L-glutamina fueron proporcionados por BioWhittaker (Lonza). Los materiales de soporte para cultivos celulares fueron de Nunc (Roskilde, Dinamarca).

El material y las soluciones utilizadas para los experimentos en los que se manipuló ARN se trataron para la inactivación de ARNasas. Todas las soluciones se prepararon usando productos reservados para este fin, así como agua libre de ARNasas y ADNasas proporcionada por *5 Prime* (GmbH, Alemania). En algunas ocasiones se utilizó material de plástico estéril para la preparación y almacenamiento de algunas soluciones.

Los ratones utilizados para la preparación de los cultivos de mastocitos derivados de la médula ósea de ratón (*bone marrow-derived mast cells*; BMMCs) fueron amablemente proporcionados por el Dr. Rafael Peñafiel (Universidad de Murcia).

Para los experimentos con basófilos, la anti IgE humana fue proporcionada por Sigma (Reino Unido). Los anticuerpos primarios anti- β -actina e HIF1 α , y secundarios ligados a peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP) fueron de Abcam (Cambridge, UK).

Para las técnicas biofísicas, la fosfatidilcolina de huevo (PC) fue proporcionada por *LipidProducts* (*South Nutfield*, UK). El fosfatidilinositol (PI) el fosfatidilinositol 4 fosfato (PIP) el fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP₂) la cardiolipina (CL) y la fosfatidiletanolamina asociada a rodamina (Rho-PE) fueron suplementados *Avanti Polar Lipids* (EE.UU.). Otros productos, como el 1-Decanol, putrescina (Put), la espermidina (Spd) la espermina (Spm), ADN y ARNt total de levaduras así como bicina fueron de Sigma-Aldrich (EE.UU.) El ácido oleico (OA; C18:1) fue de Merck (Alemania), así como metanol, dietileter y cloroformo fueron de Fisher (EE.UU.). Todos los otros materiales (sales y solventes orgánicos) eran específicos para su uso en biología molecular.

2. Cultivos celulares y métodos de biología celular

2.1. Mastocitos derivados de células de la médula ósea de ratón

Los BMMCs se obtuvieron según el procedimiento descrito con anterioridad (García-Faroldi y cols., 2010). En resumen, se dispuso de ratones *wild-type* (WT; *Azin2*^{+/+}), así como de

heterocigotos ($Azin2^{+/Gco}$) y homocigotos ($Azin2^{Gco/Gco}$) hipomórficos para *Azin2* con antecedentes genéticos de la cepa C57BL/6, como se describió anteriormente (López-García y cols., 2013). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar en el Servicio de Laboratorios Animales (Universidad de Murcia). Cuando fueron transportados a la Universidad de Málaga, fueron sacrificados por dislocación cervical (método aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga) y las células de la médula ósea de sus fémures y tibias se extrajeron y cultivaron en medio para BMMCs. Este medio consiste en una mezcla 1:1 de medio acondicionado por células WEHI-3B (ver apartado 2.2) y medio de *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con FBS al 10% (v/v) inactivado por calor 30 minutos a 56 °C, 50 U/mL penicilina, 50 U/mL estreptomicina y 2 mM de L-glutamina. Las células en suspensión se mantuvieron a una densidad celular de 0.5×10^6 células /mL a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Cada 3-4 días, las células adheridas se descartaron y el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco. El cultivo se extendió hasta un máximo de 21 días desde la extracción de células de la médula ósea.

2.2. Células WEHI-3B

La línea celular WEHI-3B fue amablemente cedida por el Dr. Gunnar Pejler (Uppsala, Suecia) quien a su vez la obtuvo de la *European Collection of Animal Cell Cultures* (ECACC). Esta línea deriva de ratones de la cepa BALB/c y el tumor original muestra muchas características de leucemia mielomonocítica humana. Además estas células producen altos niveles de IL-3 que secretan al medio, factor importante para el correcto desarrollo de mastocitos.

Estas células se cultivaron a una densidad de $0,4 \times 10^6$ células/mL en medio DMEM suplementado con FBS al 10% (v/v) inactivado por calor 30 min a 56°C, 50 U/mL penicilina, 50 U/mL estreptomicina y 2 mM de L-glutamina. Cada tres días el medio se reemplazó por medio fresco y el medio acondicionado por las células se centrifugó y se almacenó a -20°C para su posterior uso como fuente de IL-3.

2.3. Células HMC-1

La línea de mastocitos humana HMC-1 fue amablemente cedida por el Dr. Butterfield (Clínica Mayo, EE.UU.). Esta línea se cultivó 2 veces por semana en medio Iscove modificado por Dulbecco (IMDM) suplementado con glutamina 2 mM, 50 U/mL penicilina, 50 U/mL estreptomicina, suero de ternera (CS) al 10% inactivado por calor 30 min a 56 °C, suplementado con hierro y 1,2 mM de alpha-tioglicerol.

2.4. Células Kelly

La línea celular de neuroblastoma humano Kelly se cultivó 2 veces por semana en medio RPMI 1640, suplementado con FBS al 10% (v/v) suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina 50 U.I./mL, estreptomicina 50 µg/mL y anfotericina 1,25 µg/mL. Para el subcultivo se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,09 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) y posteriormente se empleó una solución de tripsina con ácido etilendiaminotetraacético (tripsina-EDTA, Lonza, Suiza) para despegar las células antes de diluirlas 1:3 en medio fresco.

2.5. Purificación de basófilos

Se obtuvieron 30 mL de sangre humana extraída de donantes sanos no seleccionados, según los permisos del comité de ética local (Kent, Reino Unido). Esta sangre se conservó en 1 mM EDTA o en heparina-litio en las siguientes 2-3 horas hasta su uso. A continuación, 15 mL se depositaron en 2 tubos sobre 20 mL de Hetasep (*StemCell Technologies*, Canada), y se

centrifugaron a 450g durante 20 minutos hasta la separación de las fases. La fase superior fue recogida y diluida 1:1 (v/v) con solución de purificación fría [*Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , suplementado con 1 mM EDTA y 2% de FBS (v/v)], tras lo cual se volvieron a centrifugar los tubos (450 g, 7 minutos) para eliminar las plaquetas no adherentes. Se retiró el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 1 mL de solución de purificación y transferido a un tubo estándar para citometría de flujo para separación celular activada por fluorescencia (*fluorescence activated celular sorting*, FACS).

En este punto, se procedió a la purificación de la suspensión celular en basófilos, mezclándola con 120 μL de un cóctel comercial de purificación de basófilos humanos (*EasySep Human Basophil Enrichment Kit*, *StemCell Technologies*, Canada), el cual contenía anticuerpos monoclonales para los siguientes antígenos de superficie: CD2, CD3, CD14, CD15, CD16, CD19, CD24, CD34, CD36, CD45RA, CD56 y glucoforina A. Tras una incubación de 10 minutos a 4°C, se añadieron 2.5 mL de solución de purificación y 80 μL de nanopartículas magnéticas (*EasySep Magnetic Nanoparticles*) a la suspensión con anticuerpos, y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, las células se transfirieron mediante un imán magnético (*EasySep Magnet*) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, las células no adheridas a las paredes se transfirieron a un tubo FACS nuevo. Una vez terminado el proceso de purificación, se contaron las células, y en adelante se realizaron los experimentos con una suspensión celular compuesta por >90% de basófilos humanos.

2.7. Tinción con May-Grünwald/Giemsa

Los BMMCs fueron resuspendidos a una densidad de 4×10^6 células/mL en medio completo, y fracciones de 100 μL fueron centrifugadas mediante *citospin* (300×g durante 5 minutos), inmovilizadas en portaobjetos y desecadas al aire durante 10 minutos. A continuación, las células se tiñeron utilizando un protocolo *May-Grünwald/Giemsa* modificado. De manera resumida, después de la fijación en metanol durante 10 minutos a -20°C, los portaobjetos se desecaron al aire y se se tiñeron con una solución de *May-Grünwald* (Fluka 63590) durante 10 minutos. A continuación, los portaobjetos se tiñeron durante 1 minuto en la misma solución *May-Grünwald* diluida 1:1 (v/v) con agua destilada, seguido de 10 minutos en solución *Giemsa* (Fluka 48900) diluida 5:95 (v/v) en PBS. Tras esto, los portaobjetos se lavaron con agua desionizada hasta eliminar el exceso de colorante y se montaron con glicerol al 50% (v/v). Las fotografías se tomaron con un microscopio *Olympus VS120 Virtual Slide Microscope* utilizando el programa *VS Software*.

2.8. Microscopía electrónica de transmisión.

La preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión se realizó siguiendo básicamente el protocolo descrito por Braga (Braga y cols., 2009) con modificaciones menores. Brevemente, se recogieron 4×10^6 células que se fijaron con glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón cacodilato (cacodilato 0,2 M pH 7,2) con sacarosa 0,1 M durante al menos 10 horas a 4°C. Tras centrifugar nuevamente, las células se resuspendieron en 150 μL de agar al 2% (p/v) en tampón cacodilato en sobrefusión y se volvieron a centrifugar. Con las células embebidas en el agar se recogió el bloque y se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% (v/v) en tampón cacodilato durante 90 minutos a 4°C y en oscuridad. El resto de pasos que se detallan a continuación se realizaron a temperatura ambiente. Después de lavar el bloque con tampón cacodilato durante 15 minutos se realizó una deshidratación con concentraciones crecientes de acetona durante 10 minutos cada una [30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100% (v/v)]. Al mismo tiempo que el paso de deshidratación con acetona al 70% (v/v) se realizó un contrastado de las muestras con acetato de uranilo al 1% (p/v) durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente se incluyó el bloque en resina. Para ello se incubó el bloque 1 hora en una mezcla acetona-resina 1:1 y una hora más en resina pura a temperatura ambiente,

dejando luego que la resina terminara de solidificar durante un día a 60°C. La resina se obtiene de la mezcla de 5,4 g de araldita 502 con 4,6 g de anhídrido dodecenilsuccinico (*Dodecenylsuccinic anhydride*, DDSA) y añadiendo posteriormente 2,4,6-tris(dimetilaminometil)-fenol (DMP-30) como agente catalizador.

Se realizaron cortes semifinos utilizando un ultramicrotomo *Reichert-Jung Ultracut E* y se tiñeron con azul de toluidina para monitorizar en qué momento los cortes contenían las células a estudiar. A continuación, se realizaron cortes ultrafinos que se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión *Philips CM-100*. Se tomaron fotografías de las regiones de interés y los negativos obtenidos fueron escaneados con un escáner *Epson Perfection 3200*.

3. Métodos bioquímicos y de biología molecular

3.1. Métodos de análisis de proteínas

3.1.1. Medidas de actividades enzimáticas

3.1.1.1. Medidas de actividad histidina descarboxilasa

El ensayo de medida de actividad HDC se realizó mediante la evaluación de la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de la histidina marcada con ^{14}C uniformemente.

Básicamente se siguió el método descrito por García-Faroldi y cols. (García-Faroldi y cols., 2009a). Tras lavar dos veces con PBS, las células se recogieron y se resuspendieron en tampón fosfato potásico 100 mM pH 6,8 suplementado con ditioneitol (DTT) 0,2 mM, piridoxal-5'-fosfato (PLP) 10 μM , polietilenglicol-300 10 mg/mL y se homogeneizaron a 4°C por sonicación aplicando 5-6 pulsos de 60 W usando para ello un aparato de ultrasonidos *Branson 250* (*Branson Ultrasonics*, EE.UU.). La reacción se realizó en tubos de vidrio de 10 centímetros de longitud cerrados con un tapón de goma perforado y atravesado por un alambre en el que se sujeta un eppendorf perforado (Figura 7). En éste se introdujo una tira de papel *Whatman 3 MM* (*Whatman*, Reino Unido) empapado en hidróxido de bencetonio (hiamina) para capturar el CO_2 liberado durante la reacción. Los extractos celulares se depositaron en los tubos de vidrio y la $\text{L}[\text{U}-^{14}\text{C}]\text{-histidina}$ se añadió a una concentración final de 20,87 μM . Los tubos se cerraron inmediatamente y se incubó la reacción durante 1 hora a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo 200 μL de HClO_4 al 5% (v/v) e incubando durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se extrajeron los papeles *Whatman* y se colocaron en tubos que contenían 4 mL de líquido de centelleo (*Ecoscint A*; *National Diagnostics*, EE.UU.). La radiactividad se cuantificó utilizando un contador de centelleo Beckman LS 6500 (Beckman, EE.UU.).

La actividad HDC se expresó como picomoles de CO_2 liberados por hora y por microgramo de proteínas totales (pmol $\text{CO}_2/\text{h}/\mu\text{g}$ proteínas).

La descripción de la medida de actividad HDC con todo lujo de detalles se ha incluido en el capítulo 13 "Evaluation of Histidine Decarboxylase (HDC) Activity and Human Histamine Receptor 3 (H3R) and HDC mRNA Levels" del libro metodológico "Histamine Receptors as Drug Targets" (ISBN: 978-1-4939-6841-1) de la editorial *Springer*. El manuscrito de este capítulo se incluye para su consulta el Anexo I (ver Anexo I).

3.1.1.2. Medidas de actividad ornitina descarboxilasa

La medida de actividad ornitina descarboxilasa se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que para la medida de histidina descarboxilasa (apartado 3.1.1.1) con algunas modificaciones. El sustrato radiactivo de esta reacción fue L-[1-¹⁴C]-ornitina (100 μ Ci/mL, 57.1 mCi/mmol), la cual estaba marcada en el carbono 1, en lugar de uniformemente como sucedía con la histidina. Para esta medida se probaron varias condiciones en las que, adicionalmente a la ornitina marcada (Orn*), se incluyó o no ornitina sin marcar (Orn) como sustrato. Las condiciones probadas fueron:

- [Orn] = 1000 μ M; [Orn*] = 48 μ M (dilución isotópica = 21,8)
- [Orn] = 666 μ M; [Orn*] = 108 μ M (dilución isotópica = 7,16)
- Únicamente [Orn*] = 108 μ M (sin dilución isotópica)

En ningún caso se consiguió detectar actividad ODC en células BMMCs. Como controles positivos se usaron células Kelly, con niveles abundantes de poliaminas y de actividad ODC (Ruiz-Pérez y cols. 2015), donde sí se detectó esta actividad, indicando que técnicamente las medidas fueron correctas.

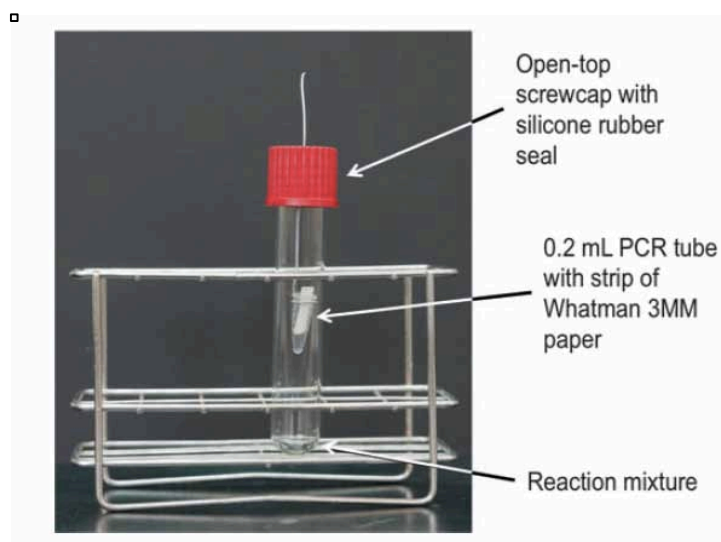


Figura 7: Sistema experimental usado para las mediciones de actividad HDC y ODC. Las flechas indican el tapón con rosca sellado por goma de caucho (flecha superior), el tubo de PCR perforado que contiene un papel Whatman 3MM (flecha intermedia) y la mezcla de reacción (flecha inferior). Tomado de Acosta-Andrade y cols., 2017 (ver Anexo I).

3.1.2. Análisis Western Blot

3.1.2.1. Separación de proteínas por electroforesis en gel desnaturalizante

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida/dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) usando el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron mini cámaras *Mighty Small II* (Hoefer, EE.UU.). En la parte inferior de la placa de electroforesis se polimerizó el gel de separación de acrilamida/bisacrilamida al 10%: tris-HCl 0,375 M pH 8,8, mezcla de acrilamida (acrilamida: N,N'-metilen-bis-acrilamida 37,5:1; BioRad, EE.UU.) al 10% (v/v), SDS al 0,1% (p/v), Tetrametiletilendiamina (TEMED) 6,7 mM, persulfato amónico al 0,1 % (p/v). Sobre el gel separador se polimerizó el gel concentrador: tris-HCl 0,125 M pH 6,8, mezcla de acrilamida al 5% (v/v), SDS al 0,1% (p/v), TEMED 6,7 mM, persulfato amónico al 0,1 % (p/v). En el gel

concentrador se practicaron unos pocillos con la ayuda de un peine colocado en el sistema antes de la polimerización de dicho gel.

Cuando las muestras eran sobrenadantes se añadió 1 parte de tampón de carga desnaturante 6x por 5 partes de muestra. En el caso de los sedimentos celulares, las proteínas contenidas en los mismos se solubilizaron añadiendo directamente tampón de carga desnaturante 1x (tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (p/v), 2-mercaptoetanol al 1,25% (v/v), azul de bromofenol al 0,05% (p/v)). Después, las muestras fueron hervidas a 100°C durante 5 minutos.

La electroforesis se realizó a 20 mA de corriente constante por gel. La composición del tampón de electroforesis fue tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS al 0,1 % (p/v).

Para los experimentos realizados en la Universidad de Kent, las células se incubaron durante los tiempos de incubación requeridos, y posteriormente se lisaron en 50 µL de tampón de lisis (125 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerina, 1 mM DTT, 0,002% azul de bromofenol, pH 6.9) y hervidos durante 5 minutos. A continuación, las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%.

3.1.2.2. *Transferencia de proteínas a soportes sólidos.*

Tras su separación en geles de poliacrilamida, los polipéptidos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en tampón de transferencia (tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% (v/v)). La transferencia de polipéptidos a la membrana se utilizó usando un campo eléctrico mediante un sistema húmedo de transferencia (*Cleaver Scientific*, Reino Unido). En este caso, se utilizó una intensidad de corriente de 200 mA durante 2 horas a 4°C.

3.1.2.3. *Inmunodetección de polipéptidos.*

Las membranas con los polipéptidos fijados en ellas se bloquearon con leche semidesnatada en polvo al 10% (p/v) en PBS con Tween-20 al 0,1 % (PBS-T) durante una 1 hora a temperatura ambiente, o alternativamente toda la noche a 4°C. Los siguientes pasos se realizaron siempre a temperatura ambiente. Tras bloquearlas, las membranas se lavaron brevemente con tampón PBS-T y se incubaron 2 horas con el anticuerpo primario diluido en albúmina sérica bovina (*bovine serum albumine*, BSA) al 2% (p/v) en PBS-T (PBS-T-BSA). Tras esto, las membranas se lavaron 3 veces, 15 minutos cada lavado con PBS-T, y se incubaron 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o de conejo dependiendo de si el anticuerpo primario estaba desarrollado en ratón o conejo, respectivamente) el cual lleva unido una peroxidasa de rábano. El anticuerpo secundario también se diluyó en PBS-T-BSA a 1:4000 o 1:5000. Después de otros 3 lavados en PBS-T de 15 minutos cada uno, se procedió al revelado de la peroxidasa incubando para ello la membrana con reactivos de quimioluminiscencia del kit *SignalFire ECL Supersignal* (*Cell Signaling Technology*, EE.UU.) durante 1 minuto de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las bandas se observaron utilizando una *Chemi Doc Imaging XRS+ Camera*, ayudada por el software *ImageLab 5.0* (BioRad, EE.UU.)

En los experimentos realizados en la Universidad de Kent, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios HRP utilizando el sistema *iBind™ Flex Western System* (*Thermo Fisher Scientific*, EE.UU.) durante 3 horas. Posteriormente, la intensidad de las bandas de Western-Blot fue determinada cuantitativamente utilizando el programa *Odyssey software* (*LI-COR Biosciences*, Reino Unido) y normalizados a la intensidad respectiva de las bandas de β-actina.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- *Anti-mMCP6*. Anticuerpo policlonal producido frente a la forma completa de la triptasa 6 de ratón (*mouse mast cell protease 6*; mMCP6). Este anticuerpo fue amablemente cedido por el Dr. Pejler (Uppsala, Suecia) y se utilizó a razón de 1:2000.
- *Anti-CPA*. Anticuerpo policlonal producido frente a la carboxipeptidasa A de ratón (*carboxipeptidase A*; CPA) (García-Faroldi y cols., 2010). Este anticuerpo fue amablemente cedido por el Dr. Pejler (Uppsala, Suecia) y se utilizó a razón de 1:2000.
- *Anti-actina, clon C4*. Anticuerpo monoclonal producido frente a un péptido en la región N terminal de la proteína, entre los aminoácidos 50 y 70, que reconoce las 6 isoformas de actina de vertebrados (*Millipore*, EE.UU.). Este anticuerpo se utilizó a razón de 1:5000.
- *Anti-TPH-1*. Anticuerpo monoclonal producido frente a la triptófano hidroxilasa 1 (*tryptophan hydroxylase 1*; TPH-1) de ratón y humana correspondiente a residuos cercanos al C-terminal de la proteína humana (*Abcam*, Reino Unido). Este anticuerpo se utilizó a razón de 1:500.
- *Anti-MITF*. Anticuerpo policlonal producido frente al factor de transcripción asociado a la microftalmia (*microphthalmia-associated transcription factor*; MITF) de ratón y humano, mediante un péptido sintético contra los residuos 451-500 del C-terminal de la proteína humana (*Abcam*, Reino Unido). Este anticuerpo se utilizó a razón de 1:1000.
- *Anti-SSAT*. Anticuerpo policlonal frente a espermidina/espermina N₁-acetiltransferasa humana (*Abcam*, Reino Unido). Este anticuerpo se utilizó a razón de 1:500.
- *Anti-HIF1 α* . Anticuerpo policlonal frente al factor inducible por hipoxia 1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) humano (*Abcam*, Reino Unido). Este anticuerpo se utilizó a razón de 1:800.
- *Anti-Nrf2*. Anticuerpo policlonal frente el factor nuclear asociado a eritroides 2 (*nuclear erythroid 2-related factor 2*) humano (*Santa Cruz Biotechnology*, EE.UU.). Este anticuerpo se utilizó a razón de 1:250.

Los anticuerpos anti-actina y anti-HIF1 α fueron desarrollados en ratón. El resto fueron desarrollados en conejo.

3.1.3. Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas totales se determinó usando el reactivo *BioRad Protein Assay* (BioRad, EE.UU.) que se basa en el método de Bradford (Bradford, 1976). En placas de 96 pocillos se mezclaron 10 μ L de muestra problema y 200 μ L de reactivo previamente diluido en agua desionizada a razón 1:4 según las indicaciones del fabricante. Tras un tiempo de incubación de 5-10 minutos, se midió la absorbancia a 595 nm. Como recta patrón se utilizaron soluciones de BSA a concentraciones conocidas: 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 μ g/ μ L. La concentración de proteínas en las muestras se calculó interpolando en la recta patrón y se expresó en μ g/ μ L.

3.2. Manipulación y métodos de análisis de ácidos nucleicos.

3.2.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total de células se utilizó el kit *Gen Elute Mammalian Total RNA Miniprep* (Sigma-Aldrich, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se extrajo el ARN total correspondiente a 4 x 10⁶ células de neuroblastoma humano (Kelly) y de mastocito humano (HMC-1). La cantidad de ARN, así como la calidad de la extracción se determinó mediante medida espectrofotométrica. Las muestras obtenidas presentaron una concentración aproximada de 0.4-0.6 μ g/ μ L. Solo se utilizó ARN altamente purificado

(A260/A280>1.95). Dado que un punto importante fue verificar la ausencia de contaminación por ADN genómico, las muestras de ARN se trataron con una enzima degradadora de este material génico (*DNase I*) usando una columna específica para la digestión del mismo *On-column DNase I Digestion Set* (Sigma-Aldrich, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.2.2. Síntesis de ADN complementario a partir de ARN

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó usando *iScript Selectc DNA synthesis kit* (BioRad, EE.UU.), el cual contiene una reverso transcriptasa ARNasa recombinante (H+ MMLV) mezclada con un inhibidor de la ARNasa recombinante. El kit utilizado permitió usar cebadores de dos tipos, que corresponden a cebadores al azar (*random primers*) o dirigidos específicamente contra el gen de interés (*user-designed gene-specific primers*). Para la síntesis de ADNc se utilizó 1 µg de ARN total en un volumen final de 20 µL, tal y como se describe a continuación en la Tabla 2.

La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un primer paso a 25°C durante 5 minutos, seguido de 30-60 minutos a 42°C. En el siguiente paso, la transcriptasa inversa fue inactivada por calor mediante una incubación a 85°C durante 5 minutos. El primer paso de incubación (25°C durante 5 minutos) no fue necesario cuando se utilizaron cebadores específicos. El ADNc producido fue guardado a -20°C hasta su uso.

Tabla 2: Elementos y volúmenes añadidos a un volumen final de 20 µL para la reacción de síntesis de ADNc a partir de 1 µg de ARN total extraído en el apartado 3.2.1.

Elementos	Cebadores al azar Volumen	Cebadores específicos Volumen
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 µL	Hasta 20 µL
Mezcla de reacción (<i>5x iScript select reaction mix</i> , BioRad)	4 µL	4 µL
Cebadores al azar	2 µL	--
Cebadores específicos (2-20 pmol)		variable
<i>Gene-specific primer enhancer solution</i> (BioRad)	--	2 µL
Muestra de ARN (1 µg ARN total)	variable	variable
Retrotranscriptasa (<i>iScript Reverse Transcriptase</i> , BioRad)	1 µL	1 µL
Total	20 µL	20 µL

3.2.3 PCR cuantitativa (qPCR)

Se utilizaron dos kit comerciales para las amplificaciones por qPCR, *1x Sybr Green supermix* (Bio-Rad) recomendado para el uso en *iCycler iQ Optical system* (Bio-Rad) y el kit *KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal* (KAPA Biosystems) utilizado para *Eco™ Real-Time PCR System* (Illumina). En ambos casos, las reacciones se llevaron a cabo utilizando un volumen final de 20 µL, añadiéndose además 200 nM de ambos cebadores, 1x de la mezcla de reacción y cantidades variables del producto de la retrotranscripción (ADNc). Las curvas estándar se prepararon mediante diluciones seriadas de los ADNc. El rango final de

concentraciones de ADNc fue equivalente al comprendido entre 400 and 0.4 nanogramos de ARN total. Se utilizó el protocolo cuyos parámetros están descritos en la Tabla 3. La lista de cebadores utilizados se describe en la Tabla 4.

La descripción detallada de las condiciones para la realización de las PCR cuantitativas para HDC, H3R y GAPDH se ha recogido en el capítulo 13 "Evaluation of Histidine Decarboxylase (HDC) Activity and Human Histamine Receptor 3 (H3R) and HDC mRNA Levels" del libro metodológico "Histamine Receptors as Drug Targets" (ISBN: 978-1-4939-6841-1) de la editorial *Springer*. El manuscrito de este capítulo se incluye para su consulta el Anexo I (ver Anexo I)

Para la amplificación de los genes descritos en el capítulo 1 de los resultados de la presente Tesis Doctoral, el protocolo hasta la formación de ADNc es similar al descrito más arriba. Sin embargo, para la amplificación por qPCR, se utilizó la mezcla de reacción *SYBRGreen® PCR Master Mix*, en un equipo *7500 Real-Time instrument* (ambos de *Applied Biosystems*, EE.UU.). Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 4. Los datos fueron recopilados y analizados mediante el programa *7500SDS software* (*Applied Biosystems*).

Tabla 3: Descripción del protocolo seguido para la amplificación y cuantificación de ADNc producido en el apartado 3.3.2.

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Amplificación/Activación de la enzima	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	5 segundos	30-40
Alineamiento	variable	20 segundos	
Extensión/Toma de datos	72°C	20 segundos	
Desnaturalización (para curva de disociación)	95°C	15 segundos	1
Alineamiento/Disociación/Toma de datos	65°C	15 segundos	Incremento hasta 95°C

Tabla 4: Lista de cebadores utilizados para la amplificación de los genes *Hdc* (Histidina descarboxilasa), *H3R* (Receptor H3 de histamina), *Gadph* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), β -actina, *Az 1-3* (antizima), *Azin 1 y 2* (antizima inhibidor), β -Gal (β -D galactosidasa transgénica de *E.coli*), *Mitf* (factor de transcripción asociado a microftalmia), *Odc* (Ornitina descarboxilasa) y *Tph1* (Triptofano hidroxilasa 1).

Gen	Secuencia de los cebadores
<i>Hdc</i>	F: GCCCAAGGGAGATGATGGAG R: GGCTGGATGCCAGGTGAAT
<i>H3R</i>	F: CCTCCGCACCCAGAACAACCTT R: AGCCGTGATGAGGAAGTACCA
<i>Gadph</i>	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC R: GGCTGGACTGTGGTCATGAG
β -actina	F: GATTACTGCTCTGGTCCTAGCA R: GCTCAGGAGGAGCAATGATCTT
<i>Az1</i>	F: GAGTTCGCAGAGGAGCAACT R: CCAAGAAAGCTGAAGGTTCG
<i>Az2</i>	F: AGTAAGTGTCCCCAGCTCCA R: ATCTTCGACAGTGGGTGAGG
<i>Az3</i>	F: CCAGGTGGGTAGGAGCACT R: AAGCAGGGGGTCAGTTGATA
<i>Azin1</i>	F: CTTTCCACGAACCATCTGCT R: TTCCAGCATCTTGCATCTCA
<i>Azin2</i>	F: GCTTAGAGGGAGCCAAAGTG R: CTCAGCAAGGATGTCCACAC
β -Gal	F: TTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGC R: GCACGATAGAGATTCGGGATTT
<i>Mitf</i>	F: GTATGAACACGCACTCTCG R: CAGGAGTTGCTGATGGTAAG
<i>Odc</i>	F: ATGGGTTCAGAGGCCAAA R: CTGCTTCATGAGTTGCCACATT
<i>Tph1</i>	F: CATCAGCCGAGAACAGTTG R: GGGACAGTCTCCATAACGTC

3.2.4. Electroforesis horizontal en geles de agarosa

Esta técnica aprovecha la carga negativa del ADN para separar fragmentos en base a su tamaño en un campo eléctrico. El ADN se observa debido a la adición de bromuro de Etidio en el gel. Este compuesto se intercala en el ADN y permite su observación bajo luz ultravioleta. Los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x (tris 40 mM, ácido acético al 0,11% (v/v), EDTA 1 mM pH 8). Las muestras se corrieron en un campo eléctrico con voltaje 100 V durante aproximadamente 40 minutos. Como tampón de electroforesis se utilizó TAE 1x.

3.3. Métodos aplicados a metabolitos.

3.3.1. Determinación de aminas biogénas intracelulares mediante HPLC.

Los contenidos intracelulares de putrescina (Put) espermidina (Spd) espermina (Spm) histamina (Hia) y serotonina (5-HT) se determinaron simultáneamente por cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC) en fase reversa. Para este fin, se siguió el protocolo descrito

por Garcia-Faroldi y cols. (2009a) con algunas modificaciones. De manera resumida, en este proceso se elaboraron rectas patrón a partir de las áreas obtenidas en los cromatogramas de mezclas de aminas a concentraciones conocidas, seguido de una posterior interpolación en dichas rectas de las áreas de los cromatogramas de muestras biológicas, todo ello utilizando un estándar interno (1,8-DO) a concentración conocida.

3.3.1.1. Preparación de soluciones estándar para rectas de calibrado.

Previo al análisis del contenido de aminas en muestras biológicas, se realizaron rectas de calibrado para cada amina usando para ello soluciones estándar de las mismas a concentraciones conocidas. Dichas soluciones estándar se muestran en la Tabla 5. En tubos de vidrio se combinó cada mezcla de la amina correspondiente (Volumen final: 1500 μ L) conteniendo 1,8-Diaminooctano (1,8 DO) 2 μ M como estándar interno.

3.3.1.2. Preparación de muestras biológicas.

Las aminas contenidas en muestras biológicas se extrajeron resuspendiendo los sedimentos celulares (normalmente 4×10^6 células) en 400 μ L de PBS 1x conteniendo 1,8-DO 6 μ M, y añadiendo 800 μ L de HClO_4 0,34 N, mezclando vigorosamente durante 1 minuto y centrifugando a 12000 x g. Se apartó el sobrenadante en un tubo de vidrio, y se realizaron 3 re-extracciones más añadiendo 100 μ L de HClO_4 0,34 N cada vez, mezclando y centrifugando. Tras esto, se obtuvo un volumen final con todos los sobrenadantes de 1500 μ L, conteniendo las aminas a analizar. Por otra parte, el sedimento con restos celulares obtenido tras la extracción de las aminas, fue resuspendido en 200 μ L de NaOH 0,3 N para cuantificar las concentraciones de proteínas, tal y como viene descrito en el apartado 3.1.3., y usar los valores obtenidos para normalizar.

3.3.1.3. Obtención de los derivados dansilados de las aminas

Una vez preparadas las muestras (aminas patrón o muestras biológicas), se añadieron 600 μ L de una solución saturada de Na_2CO_3 y 600 μ L de cloruro de dansilo (10 mg/ ml disuelto en acetona) al volumen final de 1500 μ L. Después, los tubos se cerraron y se incubaron durante una hora a 60 °C en oscuridad, agitando ligeramente los tubos cada 15 min. Tras este periodo, se añadieron a cada tubo 10 μ L de prolina (100 mg/mL) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, siempre en oscuridad. A continuación, se añadieron 1,5 mL de tolueno, se agitaron los tubos en agitator 30 s, se realizó una centrifugación, y se tomó 1 mL en el cual quedaron extraídas las aminas dansiladas. Este volumen se depositó en tubos de vidrio y el disolvente (tolueno) se eliminó mediante centrifugación en vacío con *Speedvac* (Savant Instrument, EE.UU.), quedando las aminas dansiladas como precipitados en el fondo de los tubos.

En el caso de las soluciones de aminas estándar destinadas a la confección de las rectas de calibrado, el precipitado obtenido para cada mezcla se redisolvió en 500 μ L de acetonitrilo:agua a razón 70:30 (v/v), y se aplicaron 20 μ L al sistema de HPLC. Las concentraciones finales de cada mezcla se describen en la Tabla 5.

Para el caso de las muestras biológicas, el precipitado obtenido fue redisoluelto en 160 μ L de acetonitrilo:agua a razón 70:30 (v/v), y se aplicaron 20 μ L al sistema de HPLC

3.3.1.4. Elaboración de rectas de calibrado.

A partir de los cromatogramas obtenidos con las soluciones estándar con mezclas de aminas a concentraciones conocidas (Tabla 5) se elaboraron rectas de calibrado. En el análisis

de los datos, en todos los casos se hizo un ajuste a la ecuación $\text{Área amina}/\text{Área 1,8-DO} = b [\text{amina}]/([\text{1,8-DO}] + a$, resultando coeficiente de correlación lineal al cuadrado (r^2) siempre mayor de 0,99. El límite de detección para cada amina fue de 10 pmol para Put, 200 pmol para Hia, 40 pmol para 5-HT y 4 pmol para Spd y Spm. Estas rectas patrones permitieron la posterior evaluación, por interpolación, del contenido de aminas en muestras biológicas.

Tabla 5. Concentraciones usadas para la elaboración de rectas de calibrado para aminas biógenas. 1,8-Diaminooctano (1,8 DO), putrescina (Put), espermidina (Spd), espermina (Spm), histamina (Hia), serotonina (5-HT).

Amina	Concentraciones				
1,8-DO	2 μM	2 μM	2 μM	2 μM	2 μM
Put	2,5 μM	2 μM	1,25 μM	0,625 μM	0,25 μM
Spd	2 μM	1 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,1 μM
Spm	2 μM	1 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,1 μM
Hia	60 μM	40 μM	20 μM	10 μM	5 μM
5-HT	20 μM	10 μM	5 μM	2,5 μM	1 μM

3.4.1.5. Método cromatográfico.

La separación de los derivados dansilados de las aminas se realizó utilizando una columna de 250 x 4 mm de fase reversa con matriz de 18 carbonos modelo *LiChrosorb* (Merck, Alemania). Esta columna se instaló en un sistema HPLC *Beckman System Gold* (Beckman Instruments, EE.UU.) provisto de un módulo con dos bombas (*Solvent module 125*) y un controlador-detector de UV (*Detector 168*). Para la separación cromatográfica se utilizaron dos fases móviles: A (agua:acetonitrilo:metanol 5:3:2, v/v/v); y B (acetonitrilo:metanol 3:2, v/v) que se aplicaron siguiendo un gradiente sigmoidal tal y como se explica en la Tabla 6. Los eluidos de la columna se detectaron utilizando un detector de fluorescencia *WatersMillipore* modelo 420 (Millipore, EE.UU.) con filtro de excitación a 338 nm y filtro de emisión a 425 nm. El detector de fluorescencia se conectó al sistema mediante una interfase analógica de *Agilent Technologies SS420x* (EE.UU.). Todos los datos del sistema fueron recogidos y analizados por el software informático *Karat 32* (Beckman, EE.UU.). La cuantificación de las aminas se realizó por un procedimiento de calibración relativo tal y como describieron Smith y Davies (Smith y Davies, 1985) y los resultados se normalizaron a la cantidad de proteínas totales, por lo que el contenido de aminas intracelulares se expresó en picomoles de amina por microgramo de proteína (pmol/ μg proteína).

Tabla 6. Condiciones para la cromatografía de dansilados de aminas por HPLC. Solventes: A (agua:acetonitrilo:metanol 5:3:2) y B (acetonitrilo:metanol 3:2)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A:B inicial	A:B final	Gradiente
0-3	1	72:28	72:28	-
3-13	1	72:28	60:40	Lineal
13-15	1	60:40	47:53	Lineal
15-17	1	47:54	40:60	Lineal
17-18	1	40:60	28:72	Lineal
18-20	1	28:72	20:80	Lineal
20-24	1	20:80	15:85	Lineal
24-29	1	15:85	10:90	Lineal
29-30	1	10:90	0:100	Lineal

3.4.2. Determinación de aminas extracelulares

El contenido de histamina en el medio extracelular se cuantificó utilizando un kit de ELISA competitivo (*Histamine ELISE FastTrack kit*, BA E-1700, LDN, Alemania) según se describe en las instrucciones del fabricante. De manera análoga, el contenido de serotonina en el medio extracelular se cuantificó usando también un kit de ELISA competitivo (*Serotonin Research ELISA ultrasensitive kit*, BA E-5900, LDN, Alemania). Tanto las concentraciones de histamina como de serotonina presentes en los medios extracelulares se determinaron interpolando la absorbancia obtenida en una curva patrón que se ajustó a una regresión logística de 4 parámetros. La concentración de ambas aminas biógenas se expresó en nanomoles por millón de células (nmol / 10⁶ células).

Para los experimentos realizados en la Universidad de Kent, se resuspendieron basófilos humanos purificados (1.6-2 x 10⁶ células nucleadas/mL) en 450 µL de tampón HEPES Tyrode [10 mM HEPES, 135 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 0.25% BSA (p/v) y 5.5 mM glucosa (p/v), pH 7.4] y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Seguidamente, las células fueron estimuladas con anti-IgE, con 10 µM resveratrol, o con 10 µM N(1),N(11)-dietil-norespermina (DENSpm), o bien con combinaciones de anti-IgE con uno de los dos compuestos. La liberación de Hia espontánea fue determinada a partir de células sin estimular. Los tiempos de incubación fueron de 5 minutos o de 2 horas. Las reacciones se pararon mediante centrifugación y transferencia inmediata de los sobrenadantes a nuevos viales, añadiendo tampón HEPES a 4°C sin Ca²⁺. El contenido de Hia total se determinó en células no tratadas, lisadas con ácido perclórico al 5% (v/v). En todas las condiciones, la Hia extracelular se determinó espectrofluométricamente utilizando el sistema *Technicon Autoanalyzer II* (Bran & Luebbe, Alemania) acoplado a un detector de fluorescencia *LDC FluoroMonitor III Fluorescence Detector* (Milton Roy, EE.UU.). El porcentaje de Hia liberada fue calculado en referencia al valor de Hia total.

4. Técnicas biofísicas

4.1. Preparación de vesículas

4.1.1. Vesículas formadas por fosfoinosítoles

La formación de vesículas multilaminares (*Multilamellar Vesicles*, MLV) es el paso más rápido y simple para la formación de liposomas. Se siguió el protocolo descrito por Lete y cols. (Lete y cols., 2014) con algunas modificaciones. En primer lugar, los fosfoinosítoles correspondientes (PI, PIP, PIP₂, CL) fueron mezclados en tubos de vidrio ajustado a las diferentes proporciones de PC en una solución orgánica (cloroformo:metanol 2:1, v/v). El disolvente fue evaporado hasta su total desecación mediante el uso de un flujo continuo de N₂ con una pipeta Pasteur. A continuación, las muestras se mantuvieron en una cámara de vacío durante 2 horas para remover las trazas de disolvente restantes. Tras esto, la mezcla lipídica fue rehidratada en un buffer salino (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) y se agitó vigorosamente durante 1 minuto, lo cual produjo MLV de manera espontánea por su carácter hidrófobo. Las MLV suelen contener entre 7 a 10 bicapas concéntricas, cada una de ellas separadas por una fina capa de agua. Estas vesículas tienen tamaño heterogéneo, cuyos diámetros están comprendidos en el rango de 100 a 5000 nanómetros (Figura 8).

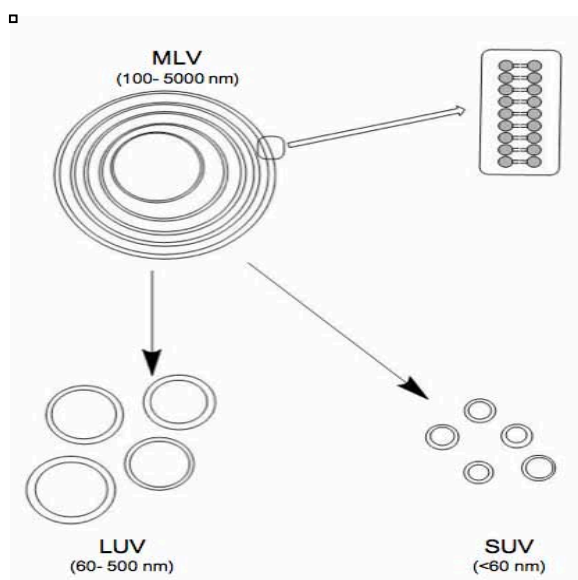


Figura 8: Esquema representativo que muestra la disposición de los fosfolípidos en diferentes tamaños de vesículas. SUV (*Small Unilamellar Vesicles*), LUV (*Large Unilamellar Vesicles*), MLV (*Multilamellar Vesicles*).

4.1.2. Formación de SUV.

Para la formación de *Small Unilamellar Vesicles* (SUV, diámetro menor de 60 nm), las MLV correspondientes fueron sometidas a sonicación con una sonda (*MSE Soniprep150*, Reino Unido) durante 40 minutos con ciclos alternos de encendido y apagado (10 segundos por ciclo) con 10 - 20 μ m de amplitud. Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso para evitar un sobrecalentamiento de las mismas. Tras esto, se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos para eliminar posibles trazas que quedaran de la sonda, y el sobrenadante se depositó en otro tubo.

4.1.3. Formación de LUV.

Para la formación de *Large Unilamellar Vesicles* (LUV, diámetro entre 60-500 nm) las MLV correspondientes se pasaron por 10 ciclos de frío/calor mediante su inclusión en un baño a 60°C, 3 minutos, y su inmersión en nitrógeno líquido durante 1 minuto. Tras esto, las MLV fueron sometidas a extrusión mecánica a través de unos filtros de policarbonato poroso de 0.1 micrómetros de diámetro (0,1 μm *pore-size Nuclepore filters*, EE.UU.) a temperatura ambiente, ayudados por una presión positiva de 18 bares de N_2 (Mayer y cols., 1986).

4.1.4. Formación de GUV.

Para la formación de Giant Unilamellar Vesicles (GUV, diámetro entre 5 y 100 μm) se utilizó un protocolo de electroformación, descrito previamente por Angelova y Tsoneva (Angelova y Tsoneva, 1999). Este método consiste en exponer una fina película de lípidos a una solución acuosa en un campo eléctrico. La formación de estas vesículas es altamente dependiente de la composición lipídica, la fuerza iónica de la solución acuosa, el pH, el voltaje y la frecuencia del campo eléctrico (Bagatoli, 2003).

De manera resumida, se preparó una mezcla lipídica (PIP:PC; 2:8 o 100 % PC en el caso de los controles) en disolvente orgánico (cloroformo:dietileter:metanol 4:5:1, v/v/v) a una concentración final 0,3 mM, utilizando en todos los casos PC mezclada con 0,2% (v/v) de Rh-PE (fosfatidiletanolamina marcada con rodamina) para su posterior observación al microscopio confocal. Con una jeringa Hamilton, se depositaron 3 μL de la mezcla lipídica sobre unos alambres de platino, que a su vez estaban superpuestos en unos pocillos politetrafluoretileno (PTFE) (Figura 9). A continuación, se eliminaron las trazas del disolvente manteniendo los pocillos en vacío durante dos horas. Tras esto, los pocillos fueron montados sobre unas cámaras especiales *PRETGUV 4 chamber* (Industrias Técnicas ITC, Bilbao, España) con huecos para dichos pocillos. Se superpuso un cristal sobre la cámara, quedando los alambres de platino casi en contacto con el mismo, y posteriormente se atemperaron los pocillos a 37°C acoplando la cámara a un baño de agua durante 15 minutos. En el siguiente paso se sustituyó el agua en los pocillos por 400 μL de una solución específica (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4), atemperada a 37°C previamente.

Una vez montado todo el sistema, se conectó la cámara a un generador de campo eléctrico (TG330 *function generator*, Thurlby Thandar Instruments, Reino Unido) y se hizo pasar un campo eléctrico a través de los alambres (500 Hz, 0.031 VRMS durante 6 minutos; 500 Hz, 0.281 VRMS durante 20 minutos, and 500 Hz, 0.623 VRMS durante 90 min) en un tiempo total de 2 horas a 37 °C. Tras esto, se dejó equilibrar el sistema durante 15 minutos, y los GUV ya formados se quedaron adheridos a la superficie de los alambres de platino.

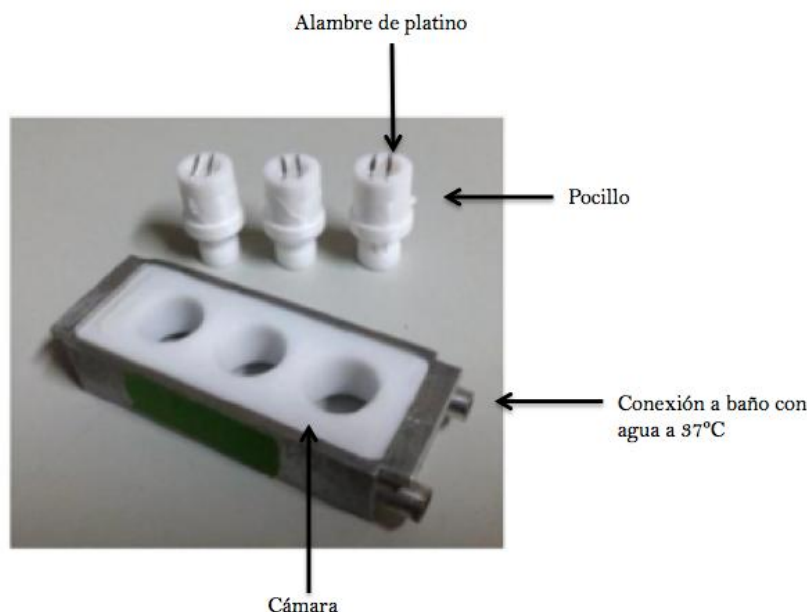


Figura 9: Cámara hecha a mano de PTFE con pocillos circulares para la formación de GUV sobre alambres de platino.

4.1.5. Formación de vesículas de ácido oleico: 1-Decanol.

Las vesículas compuestas de ácido oleico y 1-Decanol fueron formadas siguiendo el protocolo descrito por Rendón y cols. (Rendón y cols., 2012). Brevemente, se preparó una mezcla lipídica de ácido oleico y 1-decanol en proporción 5:5, usando cloroformo como disolvente. Posteriormente, las trazas del cloroformo fueron eliminadas mediante desecación utilizando un flujo continuo de N_2 con una pipeta Pasteur y, adicionalmente, 2 horas en una cámara de vacío. A continuación, se resuspendió en una solución bicina 0,2 M (Sigma, EE.UU.). Para ello, la bicina fue disuelta a temperatura ambiente en agua bidestilada y ajustando el pH, mediante adición de 1 M HCl o 1 M NaOH a un pH final de 8.3. Tras esto, se dejó reposar la suspensión lipídica 16 horas a 4°C, tras lo cual las vesículas se formaron de manera espontánea. Las concentraciones finales de lípidos usadas para los ensayos de agregación fueron de 0,3 o 0,1 mM, respectivamente.

4.2. Determinación de concentración de lípidos (Ensayo Fiske)

Dado que tanto en la formación de SUV como LUV se pueden producir pérdidas en el proceso, es necesario determinar la concentración final de lípidos una vez formadas las vesículas. Para ello, se cuantificó la cantidad final de fósforo inorgánico, siguiendo un proceso desarrollado por Fiske y Subbarow (Fiske y Subbarow, 1929) y posteriormente modificado por Böttcher y cols. (Böttcher y cols., 1961). El método consiste en un ensayo colorimétrico en el cual el grupo fosfato hidrolizado puede interaccionar con compuestos específicos que dará lugar a coloración en la solución dependiente de concentración.

De manera resumida, se depositaron por duplicado soluciones de concentración conocida (0, 25, 50, 75 y 100 nanomoles de fósforo) a partir de un stock 1mM NaH_2PO_4 , lo cual se utilizó para establecer una curva de calibración. Asimismo, se depositaron por triplicado en otros tubos las muestras con aproximadamente 50 nanomoles de fósforo en las vesículas lipídicas. A continuación, se añadieron 500 μ L de $HClO_4$ al 60% en cada tubo. Se agitó vigorosamente y se dejó reposar en un bloque a 205°C durante 1 hora. Esto dio lugar a la

hidrólisis de los fosfolípidos dando lugar a fosfato inorgánico libre. Después, se enfriaron brevemente los tubos y se depositó en cada uno de ellos 4 mililitros de solución amonio-heptamolibdato $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ y 500 μL de una solución de ácido ascórbico al 10 %, tras lo que se agitó vigorosamente y se llevó calentó a 100°C durante 6 minutos en un recipiente con agua hirviendo. Finalmente, se enfriaron los tubos y se determinó la absorbancia a 812 nm para cada una de las muestras en un espectrofotómetro *Jenway 3600* (*Bibby Scientific Limited*, Reino Unido). Para la determinación de la concentración de fosfolípidos en las muestras se interpoló a partir de la recta de calibración. En todos los casos el ajuste a la ecuación tuvo un coeficiente de correlación lineal al cuadrado, r^2 , mayor de 0,999.

4.3. Determinación del tamaño de las vesículas.

Tras la formación de SUV y LUV (apartados 4.1.2 y 4.1.3, respectivamente) se determinó el tamaño de las partículas formadas en la mezcla. Esto se basa en la medida de la dispersión dinámica de la luz (DLS). Esto se basa en el movimiento browniano de las partículas en solución. Mediante el uso de un haz de luz polarizado (laser) fijo en una pequeña área de la solución, es posible determinar variaciones en la intensidad de la luz debidas a su dispersión, a través de lo cual se puede determinar el tamaño de las partículas presentes en esa área. En este caso, el tamaño de los liposomas puede ser medido basándose en el radio hidrodinámico (Rh) de la vesícula a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = K_B T / 6\pi\eta R_h$$

donde:

D = coeficiente de difusión

K_B = constante de Boltzmann = 1.38×10^{-23}

T = temperatura

η = viscosidad del medio

R_h = radio hidrodinámico de partículas esféricas.

La luz dispersada proporciona una correlación que, mediante el uso de algunos algoritmos, proporciona la distribución de tamaños de vesículas en la muestra. Este valor viene acompañado por un índice de polidispersión (PDI), el cual da información acerca de la homogeneidad o heterogeneidad de la distribución de tamaños en la muestra. El valor PDI varía entre 0 y 1, donde valores cercanos al 0 indican una homogeneidad completa.

La determinación de los tamaños de vesículas fue llevada a cabo en un *Malvern Zetasizer nanoSystem* (Malvern Instruments, Reino Unido). Se depositaron 50 μL de las muestras en cubetas desechables (*UVette Eppendorf*, Alemania) y se realizó la medida a 663 nm de longitud de onda. Los SUV presentaron un diámetro medio de 30 nm, mientras que los LUV presentaron un diámetro medio de 100 nm. En todos los casos el valor PDI nunca fue superior a 0,172.

4.4. Ensayos de agregación

Se utilizaron ensayos de agregación en las vesículas lipídicas anteriormente descritas en los apartados 4.1.2, 4.1.3 y 4.1.5. Para SUV y LUV, se les realizó un ensayo Fiske para determinar la concentración final de lípidos en la muestra, tal y como se describe en el apartado 4.2. De manera resumida, el ensayo consiste en la medida de variaciones de la absorbancia a 400 nm como medida indirecta del estado de agregación de las vesículas en suspensión. En esencia, las partículas en suspensión apenas provocan dispersión en la luz, mientras que cuando estas agregan, el tamaño de los agregados es mayor en conjunto y ello provoca la dispersión de una cantidad de luz que puede ser medida mediante un

espectrofotómetro. Por ello, se determina que aumentos de la turbidez en la muestra tras añadir un compuesto indican un mayor estado de agregación de las vesículas en suspensión, y por ende, interacciones con el mismo, como ya se describió anteriormente (Viguera y cols., 1995; Goñi y cols., 2003).

Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación continua. Los compuestos añadidos fueron PA (Put, Spd, Spm), Mg^{2+} y ácidos nucleicos (ADN y ARNt de levaduras). Todos los compuestos fueron preparados en soluciones *stock* concentradas, disueltas en 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, incluyendo o no 1 mM $MgCl_2$ cuando las condiciones así lo requirieron, para posteriormente ser llevadas a las concentraciones finales indicadas en el apartado de resultados.

Se añadieron a una cubeta de cuarzo 1300 μ L de mezcla lipídica 0,3 mM concentración final, excepto en el caso de las vesículas de ácido oleico-1-Decanol, que también se probaron a 0,1 mM, como se describió previamente. Una vez establecida la línea base de absorbancia, se añadieron las PA correspondientes (o el Mg^{2+}) de las soluciones *stock* a las concentraciones finales indicadas. De manera análoga, una vez las variaciones de absorbancia se estabilizaron, y en los casos indicados, los ácidos nucleicos correspondientes fueron añadidos al ensayo para determinar su efecto sobre el estado de agregación del sistema. En todos los casos, la adición de los compuestos nunca supuso más de 1,5% del volumen final, para evitar el efecto de la dilución en la medida de la absorbancia. Los ensayos de agregación fueron llevados a cabo en un espectrofotómetro *Cary 3 Bio* (Varian, Australia) y documentados posteriormente. El tratamiento de los datos para la elaboración de las figuras se llevó a cabo en el software *Prism* versión 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, EE.UU.).

4.5. Ensayos con GUV. Observación y documentación mediante microscopía confocal.

La visualización de los GUV se realizó directamente en las cámaras descritas en el punto 4.1.4. Para ello, se colocó la cámara y el pocillo correspondiente en el microscopio confocal invertido de fluorescencia (Nikon D-ECLIPSE C1, Nikon Inc., EE.UU.). La longitud de onda de excitación para Rho-PE fue de 561 nm. Las imágenes fueron tomadas utilizando filtros de paso de banda para 593 ± 20 nm. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente. En las condiciones experimentales, 2 mM de Spm fue añadido a los pocillos, y se incubó entre 30 minutos y 1 hora. Tras esto, cuando el experimento lo requirió, se añadió a los pocillos 10 mM de ARNt de levaduras y se incubó entre 30 minutos y 1 hora. Desde el momento en que el pocillo fue colocado bajo el microscopio confocal hasta su retirada, se recogieron imágenes de cada pocillo en intervalos de 1 minuto y posteriormente documentado. El tratamiento de las imágenes se realizó con el programa EZ-C1 3.20 *software* (Nikon Inc., EE.UU.).

5. Análisis estadístico

La significatividad estadística para los distintos procedimientos que lo requirieron (determinación de aminos intra- y extracelulares, actividad HDC, etc.) se determinó mediante ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple *post hoc* Tukey, o bien un test de t de Student (dos colas) utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Mac (GraphPad Software, EE.UU.). Para la determinación estadística de las técnicas biofísicas también se usó el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Mac. Valores de $P \leq 0,05$ fueron considerados como significativos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resultados y discusión, Capítulo I: Un nuevo papel para el inhibidor de antizima 2 como regulador de la biosíntesis y los niveles de histamina y serotonina en mastocitos de ratón*

(*) Los resultados incluidos en este capítulo se han publicado en forma de artículo en la revista Amino Acids: Acosta-Andrade C, Lambertos A, Urdiales JL, Sánchez-Jiménez F, Peñafiel R, Fajardo I (2016) A novel role for antizyme inhibitor 2 as a regulator of serotonin and histamine biosynthesis and content in mouse mast cells. Amino Acids 48: 2411-21. doi: 10.1007/s00726-016-2230-3. Este artículo se incluye en el Anexo II.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Un nuevo papel para el inhibidor de antizima 2 como regulador de la biosíntesis y los niveles de histamina y serotonina en mastocitos de ratón

RESUMEN

AZ y AZIN son proteínas reguladoras clave en el mantenimiento de los niveles de PA, afectando a la ODC y a la incorporación de las PA desde el exterior. Estudios previos de nuestro grupo de investigación indicaban una interrelación metabólica entre las PA, Hia y 5-HT en mastocitos, y demostraron que las PA están presentes en los gránulos secretorios de los mismos. Recientemente, se ha propuesto a AZIN2 como un regulador local de la biosíntesis de PA, en asociación con gránulos que contienen 5-HT en mastocitos. Con el fin de investigar el papel de AZIN2 en la biosíntesis y almacenamiento de 5-HT e Hia, hemos generado mastocitos BMMCs de ratones *wild-type* y de ratones transgénicos con expresión hipomórfica del gen *Azin2*, y hemos analizado los contenidos de PA, Hia y 5-HT, así como algunos elementos de sus metabolismos. Como resultado, los BMMCs hipomórficos para la expresión de *Azin2* no mostraron importantes alteraciones fenotípicas a juzgar por su morfología y por las proteasas específicas de mastocitos. Sin embargo, al compararlos con los ratones control *wild-type*, estas células mostraron niveles reducidos de Spd y Spm, y una tasa de crecimiento disminuida. Asimismo, los niveles de 5-HT estaban reducidos, mientras que los niveles de Hia mostraron una tendencia a incrementarse. De acuerdo con esto, los niveles de ARNm y proteína de TPH1 (la enzima clave de la biosíntesis de 5-HT) estaban disminuidos, mientras que la actividad enzimática HDC (la enzima responsable de la biosíntesis de Hia) estaba incrementada. Además, los niveles del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), un elemento involucrado en la regulación de la expresión del gen *Tph1*, estaban reducidos. En conjunto, nuestros resultados muestran, por primera vez, que un elemento del metabolismo de las poliaminas –AZIN2–, descrito hasta la fecha como exclusivamente relacionado con el control de las concentraciones de PA, está también involucrado en la regulación de la biosíntesis y los niveles de otras aminas, como son 5-HT e Hia.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas (PA) derivadas de la ornitina (putrescina, espermidina y espermina) son pequeños policationes orgánicos presentes en todos los organismos vivos, en los que son absolutamente necesarias para la supervivencia celular. El metabolismo de las PA consiste en una serie de acciones coordinadas de varias enzimas y transportadores que llevan a cabo la biosíntesis, el catabolismo, la incorporación y/o eliminación de un amplio rango de metabolitos, todo ello con el fin de asegurar que las concentraciones intracelulares de PA son las adecuadas (Miller-Fleming y cols., 2015). Entre estas enzimas involucradas en la biosíntesis de PA, está ampliamente aceptado que la proteína clave es la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17), la cual cataliza el primer paso de la ruta biosintética (la descarboxilación de la ornitina para formar putrescina). La ODC de mamíferos es una de las enzimas con vida media más corta, y tanto su expresión como actividad están sujetas a una regulación extraordinaria (Cohen, 1998; Medina y cols., 2003; Pegg, 2006). Entre otros mecanismos, la actividad y estabilidad de la ODC están reguladas indirectamente por las propias PA, a través de un mecanismo que involucra la acción de una serie de proteínas denominadas antizimas (AZ) e inhibidores de antizima (AZIN). En los mamíferos, la familia AZ comprende tres miembros, denominados AZ1, AZ2 y AZ3. Mientras que AZ1 y AZ2 están distribuidos de manera casi ubicua, la expresión de AZ3 está restringida a los testículos durante ciertas fases de la espermatogénesis (Mangold, 2005). Los niveles elevados de PA estimulan la síntesis de AZ, los cuales se unen a ODC, inhibiéndola y llevándola a degradación a través del proteosoma 26S en un mecanismo independiente de ubiquitinación (Hayashi y cols., 1996; Coffino 2001). Además, AZ es capaz de inhibir la incorporación de PA extracelular mediante un mecanismo aún desconocido (Mangold, 2005). Por otro lado, la familia AZIN consiste en al menos dos miembros proteicos (AZIN1 y AZIN2), con una alta homología con ODC pero sin actividad enzimática, los cuales se unen a los tres AZ, inhibiendo sus acciones, quedando ODC libre y mejorando asimismo su actividad y estabilidad, así como la incorporación de PA (López-Contreras y cols., 2010). Al igual que ocurría con AZ, en este caso, AZIN1 muestra una distribución bastante amplia, mientras que AZIN2 aparece restringido a unos pocos tejidos, que incluyen testículos, cerebro, glándulas adrenales y páncreas (López-García y cols., 2013), y en ciertos tipos celulares específicos como los mastocitos (Kanerva y cols., 2009).

Al contrario que las PA, la histamina (Hia) y serotonina (5-HT) son aminas biógenas presentes sólo en un número limitado de tipos celulares, incluyendo algunas células del sistema inmune y ciertas neuronas. Cabe destacar que tanto las PA como la Hia poseen en común un esqueleto de 1,4-diamina y comparten ciertas similitudes en sus rutas metabólicas: ambos se producen a partir del metabolismo de aminoácidos catiónicos; el primer paso de su biosíntesis es una descarboxilación PLP- dependiente; su catabolismo involucra la acción de oxidasas comunes; la S-adenosilmetionina proporciona los grupos aminopropilo y metilo tanto en la biosíntesis de PA como en el catabolismo de Hia, respectivamente; y ambas aminas pueden unirse covalentemente a proteínas mediante la acción de transglutaminasas (Medina y cols., 2003; Sánchez-Jiménez y cols., 2007). Por tanto, la existencia de interferencias metabólicas mutuas parecer ser bastante probable (García-Faroldi y cols., 2009a). Para investigar esta posible interrelación metabólica entre las PA y la Hia, se seleccionaron los mastocitos, esto es, células efectoras importantes del sistema inmune en las cuales los metabolismos de ambos tipos de aminas coexisten. De hecho, trabajando con algunas líneas celulares establecidas de mastocitos y basófilos, así como con mastocitos derivados de la médula ósea de ratón (BMMCs), hemos detectado una serie de relaciones metabólicas antagonistas entre las PA y la Hia en estos tipos celulares (Fajardo y cols., 2001a; Fajardo y cols., 2001b; García-Faroldi y cols., 2009b). Además, en BMMCs hemos demostrado que las PA están presentes en los granulos secretores de los mastocitos, siendo importantes para el almacenamiento de Hia y para los niveles de 5-HT (García-Faroldi y cols., 2010).

En el año 2009, se describió que AZIN2 está presente en los mastocitos, donde los autores proponían que podría actuar como un regulador local de la biosíntesis de PA en asociación con los gránulos que contienen 5-HT (Kanerva y cols., 2009). Dado el interés y trabajo previo de nuestro grupo en la caracterización de la interrelación entre las PA y otras aminas biógenas en mastocitos, hemos llevado a cabo el presente estudio para investigar el posible papel de este nuevo elemento regulador de las PA en la biosíntesis y almacenamiento de Hia y 5-HT en este tipo celular. Para ello, se han preparado BMMCs a partir de ratones hipomórficos para la expresión de AZIN2 (López-García y cols., 2013). En estas células, y en sus correspondientes células controles *wild-type*, hemos analizado los contenidos de poliaminas, 5-HT e Hia, así como algunos elementos de sus metabolismos. Nuestros resultados muestran que AZIN2 tiene un papel en la regulación de la biosíntesis de 5-HT e Hia en mastocitos. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se ha probado que AZIN2, un polipéptido hasta la fecha descrito como implicado exclusivamente en la regulación del metabolismo de poliaminas, está también involucrado en la regulación de la biosíntesis y contenido de otras aminas como la 5-HT e Hia.

RESULTADOS

Caracterización de los BMMCs derivados de ratones hipomórficos para Azin2.

Tal y como se ha descrito en la sección de “Material y Métodos”, los ratones hipomórficos para *Azin2* expresan, en lugar de la proteína completa AZIN2, una proteína recombinante compuesta por la versión truncada inactiva de AZIN2 fusionado con la β -D-galactosidasa bacteriana, bajo el control del promotor de *Azin2*. De este modo se preserva la expresión natural del gen, aunque el producto génico es inactivo y fácilmente detectable por el reportero β -D-galactosidasa. En estos ratones, se ha confirmado la expresión de *Azin2* en testículos y cerebro, así como en glándulas adrenales y páncreas (López-García y cols., 2013). Para confirmar la expresión de *Azin2* en mastocitos, preparamos BMMCs a partir de ratones *wild-type* (WT), *Azin2* ^{β Gco} y *Azin2* ^{β Gco/ β Gco}, y se determinó la expresión del ARNm de *Azin2* y *lacZ* mediante RT-PCR. Tal y como se esperaba, se detectó expresión del ARNm de *Azin2* en WT-BMMCs, siendo esta expresión casi inexistente en *Azin2* ^{β Gco/ β Gco} BMMCs (Fig. 10a), mientras que se pudo detectar la expresión del ARNm de *lacZ* en los *Azin2* ^{β Gco/ β Gco} BMMCs y no en los WT-BMMCs (Fig. 10b). Asimismo, la expresión tanto de *Azin2* como de *lacZ* mostró niveles intermedios de ARNm en los *Azin2* ^{β Gco} BMMCs heterocigotos (Fig. 10). Con el fin de situar de forma más precisa la expresión del ARNm de *Azin2* en el contexto de sus genes parálogos, se determinaron los niveles de expresión del ARNm tanto de *Odc* como de *Azin1* en estas células. Adicionalmente, se estudiaron los niveles de expresión de ARNm para los miembros de la familia Az (*Az1*, *Az2* y *Az3*) con el fin de obtener la visión completa de los niveles de expresión del sistema génico *Odc/Az/Azin*. Teniendo en cuenta la familia de genes parálogos para *Azin2*, el ARNm de *Odc* fue más abundante que el de *Azin1* y *Azin2*. A su vez, el ARNm de *Azin1* fue más abundante que el de *Azin2*, cuya expresión sólo representaba el 2% de la expresión de los tres genes parálogos (Tabla 7). Por otro lado, el ARNm de *Az1* se expresó bastante más abundantemente que el de *Az2* e incluso más abundante que el de *Odc*, mientras que *Az3* no se pudo detectar. Por tanto, con la excepción de *Azin2*, no se observaron cambios significativos para la distribución de genes parálogos entre los BMMCs WT y los *Azin2* ^{β Gco/ β Gco}. En conjunto, estos resultados confirman que *Azin2* se expresa en mastocitos, si bien con un nivel de expresión muy bajo (expresión relativa del 0.0012 normalizado a β -actina). Además, *Az1* es el miembro principal expresado en estas células, de acuerdo con la situación típica descrita para la mayoría de tipos celulares y tejidos (Mangold, 2005).

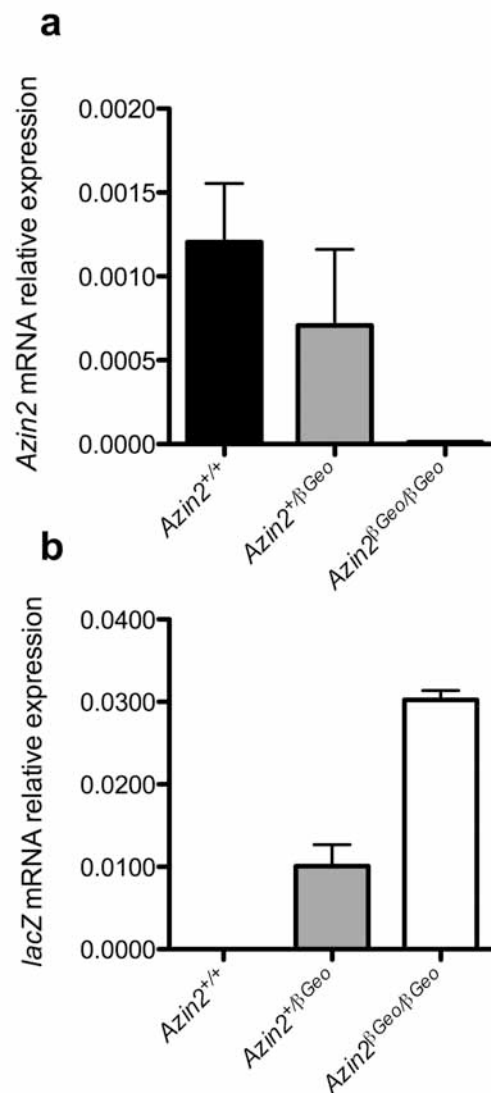


Figura 10. Análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de Azin2 y lacZ en BMMCs de ratones WT e hipomórficos para Azin2. Los BMMCs fueron preparados a partir de ratones WT (Azin2^{+/+}), Azin2^{+/βGeo} y Azin2^{βGeo/βGeo} y los niveles relativos de ARNm se para Azin2 (a) y lacZ (b) se determinaron como se describe en el capítulo de Material y Métodos. Los resultados mostrados están normalizados frente a la expresión de β-actina, y son la media ± el error estándar (SEM) de tres experimentos independientes.

Tabla 7. Expresión relativa de ARNm para genes parálogos de *Odc* y *Az* en BMMCs derivados de ratones WT (*Azin2*^{+/+}) y *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}} .

Gen	<i>Azin2</i> ^{+/+}	<i>Azin2</i> ^{β_{Geo}/β_{Geo}}
<i>Odc</i>	0.043 ± 0.013 (75%)	0.048 ± 0.018
<i>Azin1</i>	0.0132 ± 0.004 (23%)	0.0168 ± 0.008
<i>Azin2</i>	0.0012 ± 0.0003 (2%)	ND
<i>Az1</i>	0.363 ± 0.091 (93%)	0.423 ± 0.081
<i>Az2</i>	0.025 ± 0.010 (7%)	0.021 ± 0.008
<i>Az3</i>	ND	ND

Se obtuvieron BMMCs a partir de ratones WT (*Azin2*^{+/+}) y *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}} y la expresión relativa de ARNm fue determinada mediante análisis de RT-PCR, como se describió en el capítulo de Material y Métodos. Los resultados que se muestran se han normalizado en relación a los niveles de expresión de β -actina, y son media ± SEM de tres experimentos independientes. Para cada gen, se muestra el porcentaje que su expresión representa en relación a su familia de genes parálogos. ND: no detectado

A continuación, se investigaron una serie de características fenotípicas clásicas de mastocitos en BMMCs de todos los genotipos (WT, *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}} y *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}}). A partir de la observación mediante tinción *May-Grunwald/Giemsa*, la morfología de estas células no sufrió ninguna alteración importante. Tal y como se muestra en la Fig. 11a, las tres preparaciones de BMMCs genotípicamente diferentes incluyeron poblaciones de mastocitos heterogéneas con diferente grado de maduración, donde algunas células contenían gránulos secretores teñidos más densamente que otros observados, pero sin ningún cambio significativo entre los tres genotipos. Además, los análisis mediante microscopía electrónica de transmisión no mostraron tampoco alteraciones importantes entre los genotipos (datos no mostrados). También se analizaron los niveles proteicos de las proteasas específicas de mastocitos mMCP-6 y mMC-CPA mediante *Western-Blot*. Tal y como se muestra en las Fig. 11b y 11c, se obtuvieron bandas específicas fuertemente inmunoreactivas de ambas proteasas, pero sin ningún cambio significativo entre los tres genotipos. Finalmente, se evaluó la tasa de crecimiento de estas células determinando el número de células presentes en cada día de subcultivo durante la diferenciación desde células precursoras de la médula ósea hasta BMMCs, para cada cultivo (Fig. 12). Comparado con los BMMCs WT y *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}} , en los *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}} BMMCs se observó una moderada disminución en la tasa de crecimiento, siendo estadísticamente significativa en los días 7 y 11 del proceso de diferenciación. En conjunto, los resultados indican que la ausencia de *AZIN2* aparentemente no induce alteraciones fenotípicas importantes en los BMMCs, con la excepción de una pequeña reducción en su tasa de crecimiento.

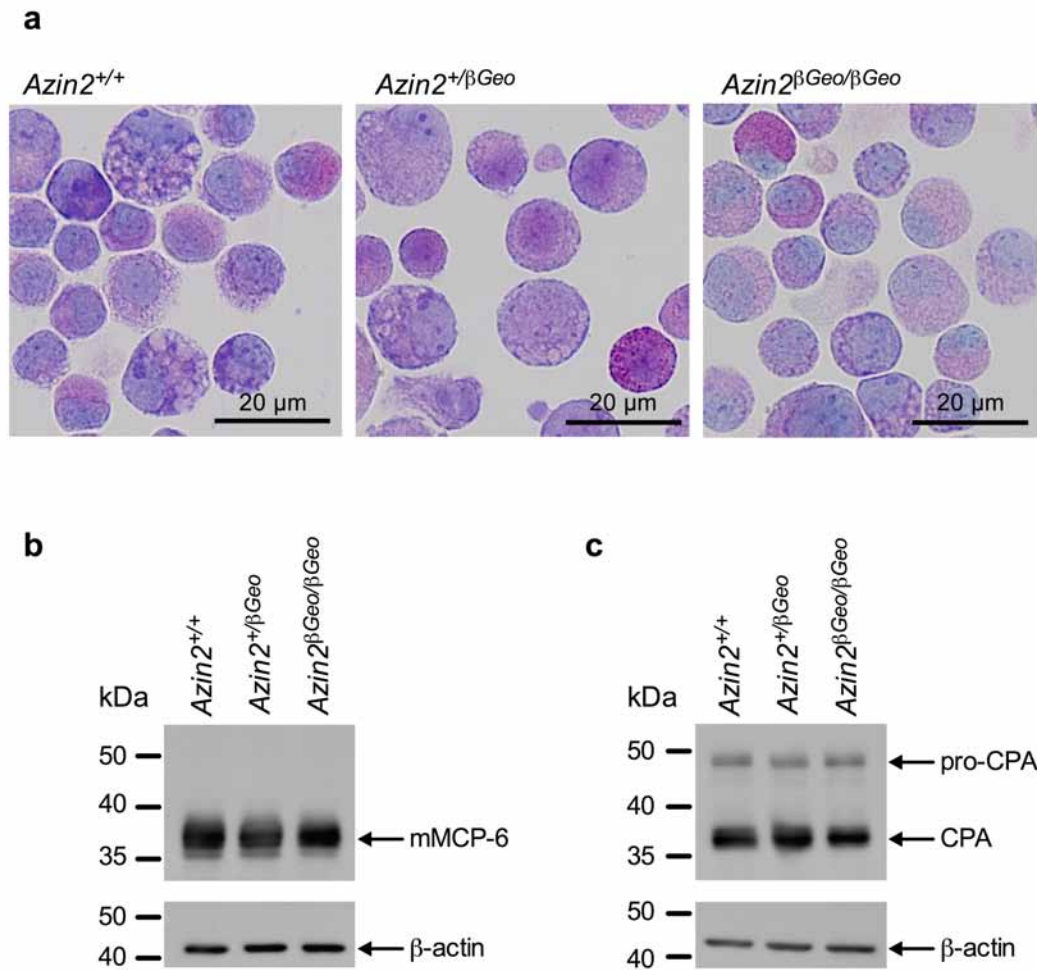


Figura 11. Principales características fenotípicas de BMMCs derivados de ratones WT e hipomórficos para *Azin2*. Se prepararon BMMCs a partir de ratones WT (*Azin2*^{+/+}), *Azin2*^{+/βGeo} y *Azin2*^{βGeo/βGeo}, se tiñeron con May-Grünwald/Giemsa (a) y se examinaron bajo microscopio óptico. Se analizaron los niveles de proteína mMCP-6 (b) y mMC-CPA (c) mediante Western blot (la expresión de β-actina se utilizó como control de carga). Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

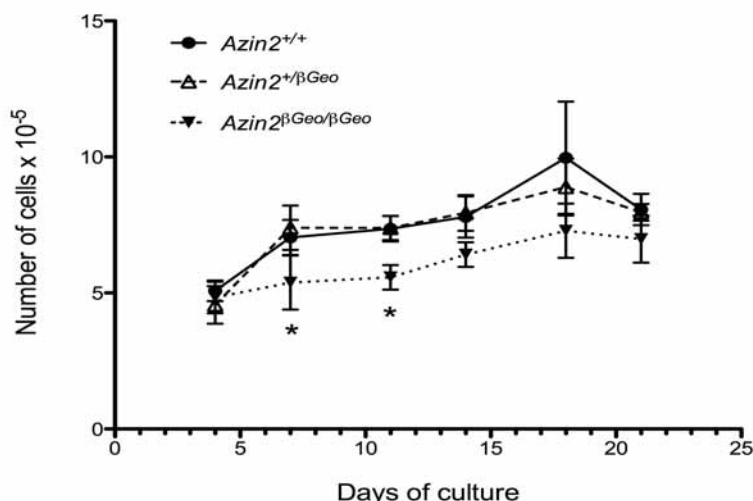


Figura 12. Tasa de crecimiento durante la diferenciación de células precursoras de la médula ósea de ratones *WT* e hipomórficos para *Azin2* hasta BMMCs. Las células se contaron en los tiempos indicados. Los resultados mostrados son la media \pm SEM de al menos cuatro experimentos independientes * $P < 0.05$ vs células *Azin2*^{+/+} y células *Azin2*^{+/βGeo} mediante análisis ANOVA seguido de un test de comparación múltiple post hoc Tukey's.

Niveles alterados de aminos biógenas en los *Azin2*^{βGeo/βGeo} BMMCs.

Con el fin de determinar si el defecto de *AZIN2* ejerce algún impacto en el metabolismo de las PA en los BMMCs, se analizaron los contenidos de PA tanto en los BMMCs hipomórficos (*Azin2*^{+/βGeo} and *Azin2*^{βGeo/βGeo}) como en los WT. Los niveles de putrescina están por debajo del límite de detección del método HPLC utilizado en los tres genotipos de BMMCs diferentes, en línea con lo esperado para la baja tasa de proliferación de estas células (la tiempo de duplicación de la población para estas células es de más de 4 días), posiblemente indicando un bajo nivel de actividad enzimática ODC. Sin embargo, los niveles de Spd y Spm estaban alterados (Fig. 13a y 13b). En los BMMCs *Azin2*^{βGeo/βGeo}, ambas poliaminas mostraron una moderada pero significativa reducción de sus niveles comparado con los control WT. De manera análoga, en los *Azin2*^{+/βGeo} BMMCs se pudo observar la misma tendencia, si bien no se pudo alcanzar la significatividad estadística. Tal y como se muestra en la Tabla 7, los niveles de ARNm para *Odc* no mostraron ninguna diferencia significativa entre BMMCs WT y *Azin2*^{βGeo/βGeo}. No obstante, hay que tener en cuenta que la regulación post-transcripcional de ODC es una característica clave que determina la cantidad neta final de actividad enzimática (Pegg, 2006). Por tanto, la reducción de los niveles de PA observados podría aun explicarse, al menos parcialmente, por una reducción de la tasa de actividad enzimática ODC como consecuencia de un incremento de la disponibilidad de AZ debido a la ausencia de *AZIN2*. Por ello, se intentó determinar la actividad enzimática ODC bajo varias condiciones. Sin embargo, no se pudo detectar ninguna actividad enzimática ODC en estas células, incluso mediante la utilización de ornitina marcada con carbono 14 (*L*-[1-¹⁴C]-ornithine) a 108 μ M sin dilución isotópica. Este resultado, junto con el hecho de que no se pudo detectar putrescina, sugiere que en estas células existe sólo una actividad ODC residual, indicando que muy probablemente estas células principalmente incorporan PA desde el exterior en lugar de realizar biosíntesis *de novo*. En este sentido, los niveles reducidos de Spd y Spm observados en los BMMCs *Azin2*^{βGeo/βGeo} podrían ser el resultado de una inhibición de la incorporación de PA desde el exterior llevada a cabo por el aumento de los niveles de AZ disponible.

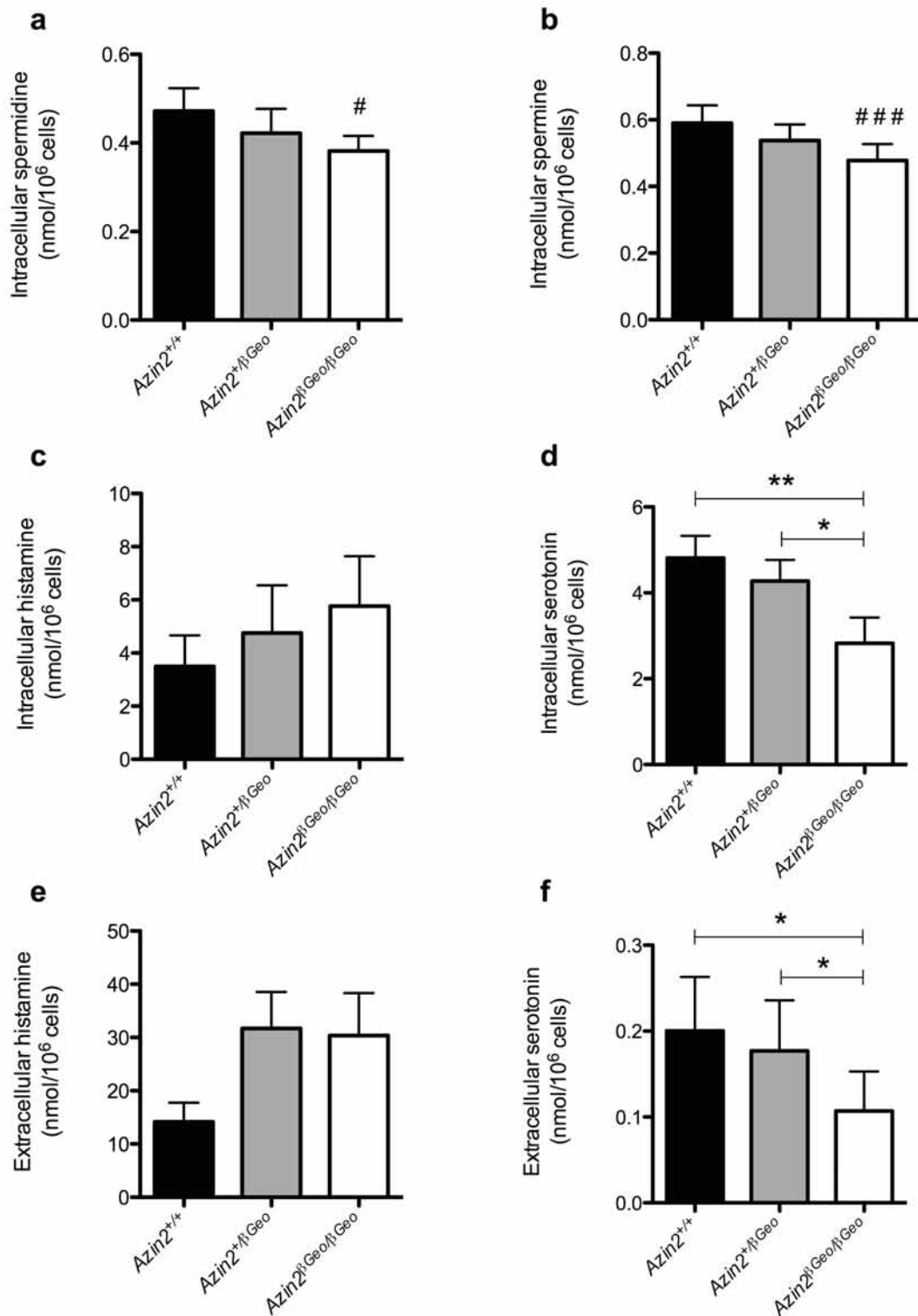


Figura 13. Niveles de poliaminas, histamina y serotonina en BMMCs WT e hipomórficos para Azin2. Los niveles intracelulares de espermidina (a), espermina (b), histamina (c) y serotonina (d) se determinaron como se describe en el capítulo de Material y Métodos. También se midieron los niveles extracelulares de histamina (e) y serotonina (f). Los resultados mostrados son la media \pm SEM de al menos cuatro experimentos independientes. [#]P < 0.05; ^{###}P < 0.001 comparado con células control Azin2^{+/+} mediante un test de Student's simple pareado (dos colas). *P < 0.05; **P < 0.01 mediante ANOVA seguido de un test de comparación múltiple post hoc Tukey's.

A continuación se investigó si el defecto en AZIN2 tenía algún efecto en los niveles de Hia y 5-HT en BMMCs. Tal y como se muestra en la Fig. 13 tanto los niveles intracelulares como los extracelulares de Hia experimentaron un incremento en los BMMCs hipomórficos para AZIN2, si bien no se alcanzó la significatividad estadística. Sin embargo, si se observó una reducción estadísticamente significativa de los niveles intra y extracelulares de 5-HT en los $Azin2^{\beta_{Geo}/\beta_{Geo}}$ BMMCs comparado con los WT. Una tendencia similar pudo observarse en los $Azin2^{+/ \beta_{Geo}}$ BMMCs, pero sin significatividad estadística comparado con los WT.

Los niveles alterados de aminas biógenas en los $Azin2^{\beta_{Geo}/\beta_{Geo}}$ BMMCs son resultado de tasas de biosíntesis modificadas.

El descubrimiento de que los niveles extracelulares de Hia y 5-HT así como los intracelulares en los BMMCs $Azin2^{\beta_{Geo}/\beta_{Geo}}$ sugiere una alteración en la tasa de biosíntesis de ambos tipos de aminas, no en su almacenamiento. Para probar esta hipótesis, se analizaron los elementos clave de la biosíntesis de Hia y 5-HT, esto es, HDC y TPH1. Previamente, se ha observado que durante el proceso de diferenciación de los precursores de la médula ósea en BMMCs, la expresión y actividad enzimática HDC muestra un pico alrededor del día 7, manteniéndose activa durante la segunda semana de cultivo, y posteriormente disminuyendo hasta niveles indetectables (Ringvall y cols., 2008; García-Faroldi y cols., 2009b). Por el contrario, la expresión de TPH1 tiene lugar durante la segunda semana de cultivo y se mantiene activa durante más tiempo (Ringvall y cols., 2008). Por este motivo, se analizaron la actividad HDC en los BMMCs de 11 días, y la TPH-1 en células de 21 días de diferenciación. Tal y como se muestra en la Fig. 14a, la actividad enzimática HDC se incrementó aproximadamente 2 veces en $Azin2^{\beta_{Geo}/\beta_{Geo}}$ BMMCs comparado con los controles WT. Asimismo, los $Azin2^{+/ \beta_{Geo}}$ BMMCs heterocigotos también mostraron la misma tendencia, pero sin significatividad estadística. Por otro lado, los niveles de expresión de ARNm de *Tph1* estaban reducidos tanto en los BMMCs heterocigotos como homocigotos hipomórficos para *Azin2* (Fig. 14b), mientras que los niveles de proteína (estudiados mediante *Western-blot*) se redujeron substancialmente sólo en los $Azin2^{\beta_{Geo}/\beta_{Geo}}$ BMMCs (Fig. 14c). De manera resumida, estos resultados indican que lo más probable es que el patrón de modificación observado en las aminas en BMMCs con la ausencia de AZIN2 sea consecuencia de una alteración en su biosíntesis, en lugar de en su almacenamiento.

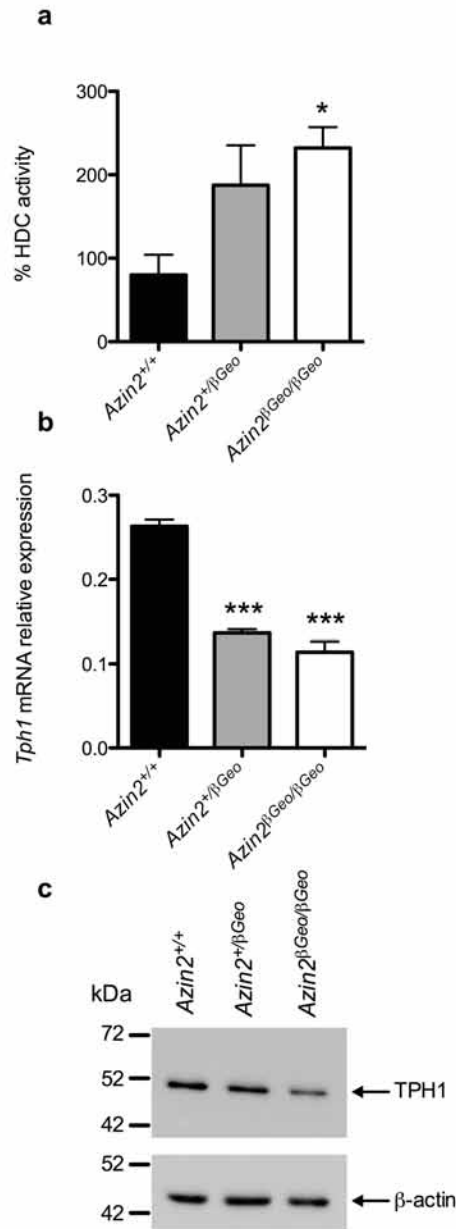


Figura 14. Actividad enzimática HDC y niveles de ARNm y proteína para *Tph1* en BMMCs WT e hipomórficos para *Azin2*. La actividad enzimática HDC se determinó en células en día 11 de desarrollo (a) mientras que los niveles de ARNm para *Tph1* (b) y su proteína (c) fueron estimados en células de día 21 de desarrollo mediante RT-PCR y Western blot, respectivamente. Los resultados mostrados en (a) están expresados en porcentajes de actividad HDC tomando los valores de BMMCs *Azin2*^{+/+} como control (100 %) y son la media ± SEM de cuatro experimentos independientes. Los resultados mostrados en (b) están normalizados frente a la expresión de β-actina y son la media ± SEM de tres experimentos independientes. En (c), la β-actina fue utilizada como control de carga, y los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes. *P < 0.05; ***P < 0.001 vs células control *Azin2*^{+/+} mediante ANOVA seguido de un test de comparación múltiple post hoc Tukey's.

Por último, se trató de investigar más en profundidad el mecanismo subyacente a la disminución observada en la regulación de *Tph1* presente en los *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}} BMMCs. Previamente, se ha descrito que la expresión de *Tph1* es dependiente de MITF en mastocitos (Ito y cols., 1998). Por tanto, se evaluó la expresión de los niveles de MITF mediante RT-PCR y *Western-Blot*. Como se muestra en la Fig. 15a, los niveles de ARNm de *Mitf* experimentaron una moderada pero significativa reducción en los *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}} BMMCs comparados con los WT. Adicionalmente, los análisis por inmunodetección *Western blot* mostraron una serie de bandas inmunoreactivas correspondientes con el tamaño predicho para MITF (52 kDa) que estaban disminuidas en los BMMCs hipomórficos para *Azin2* (Fig. 15b), en línea con lo observado para el ARNm.

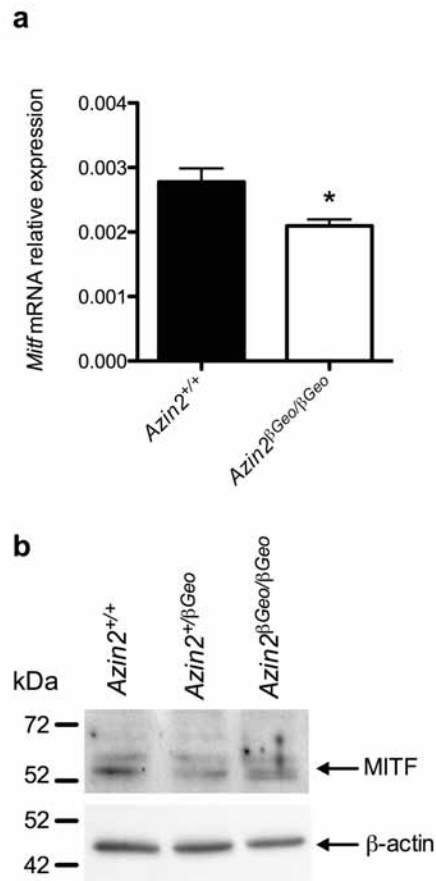


Figura 15. Niveles de ARNm para *Mitf* y su proteína en BMMCs WT e hipomórficos para *Azin2*. Los niveles relativos de ARNm para *Mitf* (a) y los niveles de proteína MITF (b) fueron determinados mediante RT-PCR y *Western blot*, respectivamente. Los resultados mostrados en (a) fueron normalizados frente a β -actina y son la media \pm SEM de tres. En (b), la β -actina fue utilizada como control de carga, y el resultado mostrado es representativo de tres experimentos independientes.. * $P < 0.05$ comparado con células control *Azin2*^{+/+} control mediante un test simple pareado de Student's (dos colas)

DISCUSIÓN

Azin2 es un gen parálogo de *Odc*, que fue denominado originalmente como *Odc-p* o *ODC-like* (Pitkänen y cols., 2001), cuyo producto (la proteína AZIN2) se confundió inicialmente con una arginina descarboxilasa (Zhu y cols. 2004), que posteriormente demostró ser un nuevo inhibidor de antizima sin actividad descarboxilasa (Lopez-Contreras y cols., 2006; Kanerva y cols., 2008; Snapir y cols., 2008) y con la capacidad de estimular la incorporación de PA desde el medio extracelular en mamíferos, anulando el efecto inhibitor de las AZs sobre dicha incorporación (López-Contreras y cols., 2008). A diferencia de AZIN1, la cual está presente de manera ubicua, AZIN2 posee una distribución en los tejidos mucho más restringida. En este sentido, se ha descrito su expresión en testículos, cerebro, glándulas adrenales y páncreas (Ramos-Molina y cols., 2015). Es interesante destacar que la expresión de AZIN2 parece estar asociada a tipos celulares específicos en lugar de poseer una distribución homogénea en los tejidos. De este modo, AZIN2 ha sido descrita en tipos celulares tan diversos como células germinales haploides en los testículos, neuronas del hipocampo y el cerebelo, así como en células de la médula adrenal en las glándulas adrenales, o incluso en los islotes de Langerhans (López-García y cols., 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que AZIN2 se expresa también en MC (Kanerva y cols., 2009). A nivel subcelular, AZIN2 se expresa principalmente asociado a estructuras membranas. En células COS-7 y HEK293 transfectadas, esta proteína fue localizada tanto en el retículo endoplasmático como en compartimentos de la red cis-Golgi (López-Contreras y cols., 2009), mientras que en las neuronas se ha encontrado en vesículas post-Golgi de la vía secretora (Kanerva y cols., 2010). Asimismo, AZIN2 ha sido descrito en estrecha asociación con el subtipo que contiene 5-HT de los gránulos secretores en MC (Kanerva y cols., 2009). De manera resumida, AZIN2 se expresa en varios tipos celulares asociado a actividad secretora. Si se tiene en cuenta, además, su localización subcelular, todo lleva a pensar que AZIN2 puede estar implicada en el tráfico vesicular y en los procesos secretores en estrecha asociación con estructuras membranas. Este hecho se ve corroborado por una serie de estudios que muestran que las PA podrían actuar en los procesos secretores en diferentes sistemas. Por ejemplo, nuestro grupo de investigación describió hace unos años que las PA están presentes en los gránulos secretores de MC, en los cuales las PA son importantes en la homeostasis de los gránulos (García-Faroldi y cols., 2010). Análogamente, otro estudio mostró que la depleción de PA en diferentes tipos celulares podría afectar al tráfico de vesículas intracelular (Kanerva y cols., 2010). A pesar de todos estos datos, es cierto que la principal función fisiológica de esta proteína aún no ha sido identificada.

Los MC son un frente importante tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa representando el paradigma de las células secretoras. En sus gránulos secretores, los MC almacenan una gran variedad de componentes (aminas biógenas, proteasas específicas, citoquinas, etc.) que son liberados en respuesta a los estímulos apropiados, y que dan lugar a efectos relacionados con los procesos alérgicos y la inflamación, entre otros (Wernersson y Pejler, 2014). Estudios previos de nuestro grupo de investigación en este tipo celular muestran que existen una serie de relaciones metabólicas entre las PA y otras aminas biógenas (Fajardo y cols., 2001a, b; García-Faroldi y cols., 2009b) reforzando la hipótesis de que los metabolismos de diferentes aminas biógenas deben estar coordinados en estas células. Gracias a la posibilidad de trabajar con ratones hipomórficos para la expresión de *Azin2* (López-García y cols., 2013), se llevaron a cabo los experimentos expuestos en este primer capítulo de la presente Tesis Doctoral, conducentes a investigar el posible papel de AZIN2 como un elemento regulador de las PA con una contribución a dicha coordinación en mastocitos, y también con el objetivo general de elucidar su función en este tipo celular. Los resultados corroboran que este gen se expresa en MC, aunque con un nivel bajo de expresión. De hecho, si se compara con otros tejidos en los que *Azin2* se expresa predominantemente, como son cerebro y testículos, y donde los ratios de expresión respecto a *Azin1* son de 6 y 23 veces más,

respectivamente (López-Contreras y cols., 2008), en los BMMCs *Azin2* se expresa 11 veces menos que *Azin1*. Este hecho podría sugerir que, en estas células, la mera inhibición de AZ y consecuente activación de ODC e incorporación de PA extracelulares estaría sobradamente cubierta por AZIN1, y que la presencia residual de AZIN2 podría ser incluso redundante, sin esperarse efecto alguno derivado de su eliminación. Tal sugerencia se sustentaría además por estudios previos llevados a cabo con células transfectadas con sobreexpresión de estas proteínas, en los que se encontró que tanto AZIN1 como AZIN2 ejercen efectos similares sobre el metabolismo de PA (López-Contreras y cols., 2006, 2008). Sin embargo, aunque los BMMCs hipomórficos para *Azin2* parecen fenotípicamente sin cambios respecto al *wild-type* (esto es, muestran tanto morfología como un perfil de expresión de proteasas de MC normales), si se observó una leve reducción en la tasa de crecimiento y niveles disminuidos de Spd y Spm en estas células. Este resultado sugiere que, a pesar de ser cuantitativamente minoritario respecto a *Azin1*, *Azin2* parece tener un impacto significativo en la regulación del metabolismo de las PA en este tipo celular. Además, la retirada de AZIN2 resultó en una disminución en los niveles de 5-HT así como en una tendencia al incremento de los niveles de Hia en BMMCs, lo cual sugiere la participación de este polipéptido también en la regulación de los metabolismos de otras aminas biógenas. A favor de este supuesto, los BMMCs *Azin2* ^{β_{Geo}/β_{Geo}} mostraron una reducción tanto en la expresión de ARNm como de proteína para TPH1, al igual que un incremento en los niveles de actividad enzimática HDC. Aún no se conoce el mecanismo que explique los fenómenos observados, si bien en el caso de la biosíntesis y contenido de 5-HT, nuestros resultados indican que la ausencia de AZIN2 afecta a los niveles de MITF y, por tanto, a los de TPH1. Los resultados observados en este primer capítulo concuerdan con los observados en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, en los que BMMCs tratados con DFMO y, por tanto, con depleción de PA, resultaron en un incremento de los niveles de Hia, así como en un moderado incremento de los niveles de ARNm y proteína HDC, y de un aumento de la actividad enzimática a los 7 días de crecimiento (García-Faroldi y cols., 2009b). Asimismo, en estas condiciones se observó una reducción en los niveles de 5-HT a los 21 días (García-Faroldi y cols., 2010). Todo ello sugiere que los efectos observados en el presente trabajo al retirar AZIN2 son debidos a los niveles de PA. Es especialmente interesante clarificar si los tres tipos de PA están involucradas en la regulación de la síntesis de aminas biógenas, o bien sólo una o dos de ellas son responsables de dicha regulación, puesto que en los experimentos mencionados anteriormente con DFMO, se pudo observar una depleción completa de Put y Spd, acompañada de un ligero incremento de Spm, mientras que en el trabajos presente, en contraste, se ha observado sólo una leve reducción en los niveles de Spd y Spm al retirar AZIN2. Por otra parte, otra posibilidad es que AZIN2 pueda afectar a los niveles de TPH1 y HDC sin la implicación de las PA, lo cual requeriría futuros experimentos para ser esclarecido. En cualquier caso, el conjunto de los resultados aquí presentados es compatible con que AZIN2 juegue algún papel en el control y coordinación de la biosíntesis y el contenido de Hia y 5-HT en mastocitos, y este hecho, que concuerda con las funciones previamente sugeridas para AZIN2 de participación en procesos secretorios, es la principal novedad de este estudio.

La posibilidad de que AZIN2 asuma este papel podría ser importante en la configuración de los sistemas inmunes y neuroendocrinos, entre otros. En este punto, es importante mencionar que tanto las PA como Hia y 5-HT comparten varios escenarios fisiológicos, incluyendo el sistema nervioso central y periférico, el tracto gastrointestinal, el eje entérico cerebro-estomago, y los sistemas inmune y reproductivos. Nuestros resultados muestran que, a pesar del hecho de que la expresión de *Azin2* parezca ser minoritaria en mastocitos de ratón respecto a otros genes parálogos (*Odc* y *Azin1*), se pueden observar alteraciones importantes en la biosíntesis, contenido y secreción de aminas biógenas. Por tanto, se puede sugerir que diferencias en el ratio *Azin2/Azin1* o *Azin2/Odc* en algunos tejidos u organismos, podrían explicar diferencias fenotípicas relacionadas con la patofisiología de las aminas biógenas. Esto podría ser interesante para la medicina personalizada, no sólo en el

campo de la inmunología, sino también en las áreas de la neuroendocrinología y la neurología, entre otras.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resultados y discusión, Capítulo II: Papel de SSAT en la regulación de las aminas biógenas en basófilos y mastocitos humanos*

(*) Los resultados incluidos en este capítulo los ha obtenido el doctorando durante una estancia de tres meses realizada en el laboratorio del Doctor Bernhard Gibbs, Universidad de Kent, Reino Unido.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Un estudio del posible papel de SSAT en la regulación de las aminas biógenas en basófilos y mastocitos humanos

RESUMEN

Las poliaminas (PA) son esenciales para el crecimiento y proliferación en células eucariotas, siendo su ruta de biosíntesis y degradación claves. La espermidina/espermina N₁-Acetiltransferasa (SSAT) es la enzima clave en la degradación de PA. La SSAT está presente en pocos tipos celulares, pero su expresión puede ser inducida por análogos de PA que inducen y estabilizan la transcripción y traducción de SSAT, como son el resveratrol y DENSpm. En BMMCs se han detectado previamente variaciones interesantes entre las aminas biógenas cuando disminuyen los niveles de PA. Para trasladar estas condiciones al modelo humano, se investigó la posibilidad de utilizar resveratrol y DENSpm en basófilos humanos purificados y en la línea celular de mastocitos humanos, LAD2. Como resultado, en ambos tipos celulares los compuestos produjeron una inhibición de la liberación de Hia por desgranulación elicitada con IgE/anti-IgE. Se investigó la posibilidad de que una sobreexpresión de SSAT produjese variaciones en varias proteínas del metabolismo de las aminas biógenas. Como resultado, sólo HIF1 α y TPH1 mostraron diferencias significativas. Por último, se intentó determinar los niveles intra y extracelulares de PA mediante HPLC. Desafortunadamente, solo se pudo detectar los niveles de Hia, que disminuyen en ambos tratamientos de manera independiente de IgE/anti-IgE. Futuros experimentos serán necesarios para elucidar los procesos moleculares por los que ambos compuestos inhiben el proceso de la desgranulación.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas (PA) son esenciales para el crecimiento y proliferación en células eucariotas, lo que ha dado lugar a proponer que su biosíntesis puede ser diana en tratamientos contra la neoplasia (Marton y Pegg, 1995). Así, las PA y sus actividades enzimáticas de biosíntesis suelen estar elevadas en tumores en comparación con tejidos sanos (Tabib y Barach, 1998). De hecho, la inhibición de la enzima responsable de la biosíntesis de PA, la ornitina descarboxilasa (ODC) está siendo evaluada actualmente en ensayos clínicos contra el cáncer de colon y neuroblastoma infantil (McLaren y cols., 2008; Lozier y cols., 2015).

La espermidina/espermina N₁-Acetiltransferasa (SSAT) es la enzima clave en la degradación de PA. El catabolismo de las PA ha sido relacionado con el estrés oxidativo, dado que una elevada tasa en la degradación de estas aminas biógenas produce un exceso de peróxido de hidrógeno por acción de las amino oxidasas (Pegg, 2009). Por otro lado, se ha descrito que la espermina (Spm) puede actuar como neutralizador de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ha y cols., 1998). La SSAT está presente en pocos tipos celulares, pero su expresión puede ser inducida por análogos de Spm y por otras aminas (Uimari y cols., 2009; Fajardo y cols., 2001a). Por este motivo, la mayoría de las investigaciones en SSAT se han llevado a cabo utilizando “superinductores”, esto es, análogos de PA que inducen y estabilizan la transcripción y traducción de SSAT. En esta línea, la inducción de SSAT se ha relacionado con la inhibición de la apoptosis y la proliferación en diferentes tipos celulares, especialmente en células tumorales (Uimari y cols., 2009). La SSAT puede ser inducida, asimismo, por factores paracrinos como LIF y IGF1 (Green y cols., 1998) y por compuestos naturales, como el resveratrol (Wolter y cols., 2003).

Cabe destacar que, en experimentos de nuestro grupo de investigación en células de neuroblastoma, la sobreexpresión de SSAT ha dado lugar a cambios en diferentes características metabólicas (Ruiz-Perez y cols., 2015) y en la respiración (resultados no publicados). Asimismo, se puede especular que células basofílicas malignizadas podrían tener niveles muy bajos de SSAT en el estado proliferativo, tal y como se observó en trabajos previos con mastocitos (Chaves y cols., 2007) incrementándose en la fase estable del crecimiento o tras la inducción con otras aminas. También se ha observado un comportamiento antagonista entre SSAT e HIF1 α en un trabajo previo de nuestro grupo. Adicionalmente, la isoforma 2 de SSAT se ha descrito como un componente esencial del complejo ubiquitin-ligasa que regula la degradación de HIF1 α en células HEK-293T (Baek y cols., 2007). Sin embargo, esta relación no se ha comprobado aún en mastocitos ni basófilos.

Por otro lado, uno de los elementos más importantes que regulan la expresión de SSAT es el factor nuclear relacionado eritroide 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*, Nrf-2). Nrf-2 es un factor de transcripción tipo dedos de Zinc descrito previamente como un sensor de ROS. Además, la inducción de SSAT por elevados niveles de Spm involucra a Nrf-2 mediante sus interacciones con el factor modulador de las PA (Wang y cols., 1999). Dado que durante el proceso de la desgranulación de mastocitos *in vivo* se produce una elevación de los niveles de ROS, es posible que la expresión de Nrf-2 se vea alterada, relacionándolo a su vez con los niveles de SSAT.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han descrito que la depleción de PA utilizando un compuesto químico (DFMO) da lugar a algunas alteraciones en el desarrollo de los gránulos y en el proceso de desgranulación en BMMCs (García-Faroldi y cols., 2009a, 2010). Asimismo, hemos desarrollado BMMCs con niveles endógenos reducidos de PA en los que se ha observado una menor tasa de crecimiento y variaciones interesantes en los metabolismos de otras aminas, como Hia y 5-HT (Acosta-Andrade y cols., 2016). Sin embargo,

estas interacciones se han descrito en mastocitos de ratón, y sería interesante estudiarlas en un modelo humano.

RESULTADOS

Efecto de resveratrol y DENSpm sobre la liberación de histamina en basófilos humanos y en la línea celular de mastocitos humanos LAD2

Se purificaron basófilos a partir de muestras de voluntarios sanos, y se dispusieron en tampón salino para los siguientes experimentos. En primer lugar, se realizó un estudio piloto sobre los efectos de los compuestos en la liberación de Hia. Se ensayaron varias concentraciones de los tratamientos tanto para resveratrol (0,1-100 μM) como para DENSpm (0,1-100 μM). Estos estudios se realizaron en basófilos sin estimular, así como elicitados para la desgranulación mediante IgE/anti-IgE. Como se observa en Fig. 16, en los basófilos no estimulados con IgE/anti-IgE no se observaron diferencias en la liberación de Hia (liberación espontánea), si bien sí se produjo una inhibición dosis-dependiente de dicha liberación cuando ésta se elicita específicamente añadiendo IgE/anti-IgE. En base a los resultados obtenidos, se seleccionó 10 μM como la concentración de uso en los siguientes experimentos para ambos compuestos, pues esta concentración fue prácticamente la mínima con la que se obtuvo el máximo efecto posible.

□

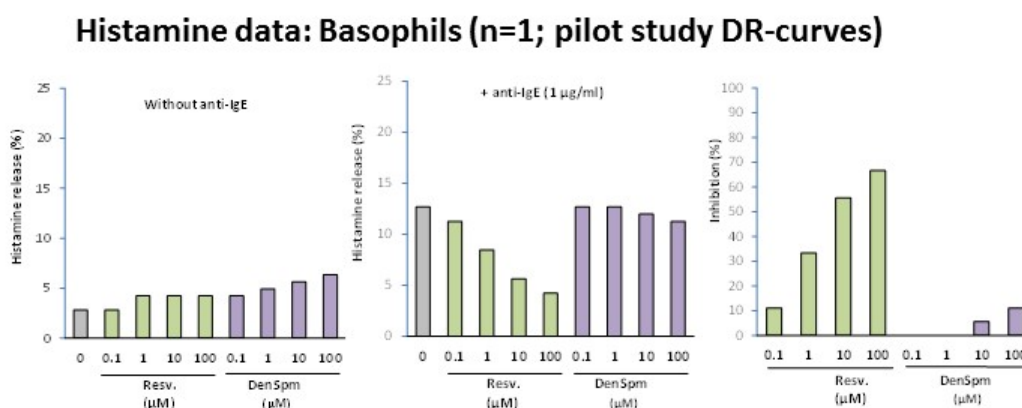


Figura 16. Estudio preliminar de la liberación de histamina espontánea ("without anti-IgE") o elicitada mediante IgE/anti-IgE ("+ anti-IgE 1 $\mu\text{g/ml}$ "), en condiciones de ausencia o presencia de resveratrol (Resv) y DENSpm a distintas concentraciones. En el gráfico de la derecha se muestran los porcentajes de inhibición en la liberación de Hia observada en el panel central.

Una vez establecida la concentración óptima de 10 μM para ambos compuestos ensayados, se realizó un experimento con seis condiciones diferentes y por sextuplicado para poder obtener significatividad estadística: basófilos sin tratar (liberación espontánea de Hia), basófilos tratados sólo con uno u otro compuesto, basófilos elicitados para la desgranulación con IgE/anti IgE, y una combinación de elicitación y resveratrol o DENSpm. Como resultado (Figura 17), se pudo observar que los compuestos afectan ligeramente a la liberación espontánea de Hia, aunque no de manera significativa. Sin embargo, ambos compuestos fueron capaces de inhibir la liberación de Hia cuando se estimula la desgranulación mediante IgE/anti-IgE. De manera más precisa, se observó que la inhibición producida por el resveratrol es significativa, llegando a ser incluso del 80%. Por otra parte, existe una importante tendencia inhibitoria por parte del DENSpm, aun sin llegar a ser significativa estadísticamente.

□

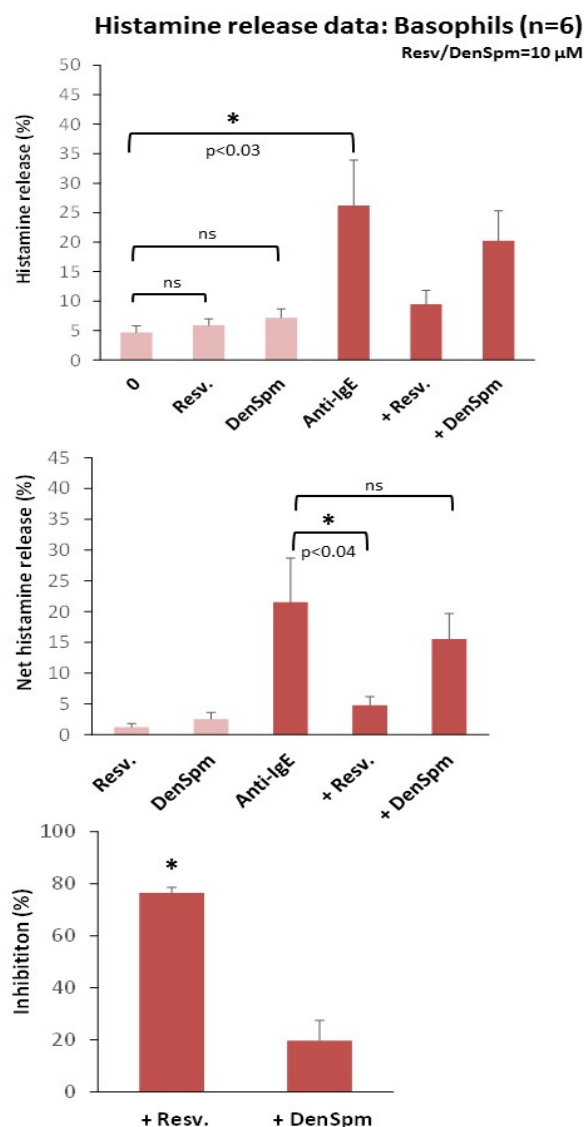


Figura 17. Liberación de Hia en basófilos humanos purificados en presencia y ausencia de resveratrol (Resv) y DENSPm 10 μ M, en condiciones de estimulación de la desgranulación con IgE/anti-IgE y sin ésta (liberación de Hia espontánea). Los resultados se expresan como porcentajes de liberación de Hia (panel superior), porcentajes de liberación de Hia neta (en relación a la liberada espontáneamente; panel central) y porcentajes de inhibición de la liberación de Hia respecto a basófilos estimulados con IgE/anti-IgE pero no tratados. Los resultados son media \pm desviación estándar (SD) de 6 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en el punto anterior parecen indicar que ambos compuestos afectan al proceso de la desgranulación elicitada por IgE/anti IgE. Sin embargo, dado que esto se ha observado mediante la medida de liberación de Hia, no se puede descartar la posibilidad de que estén afectando a la síntesis de Hia endógena, y por tanto, una disminución de la Hia detectada tras la liberación. Para comprobar o descartar este supuesto, se determinó la cantidad de Hia total en basófilos tratados con resveratrol y DENSPm, y en basófilos sin tratar. Tal y como se muestra en la Figura 18, no se observaron diferencias significativas en los niveles totales de Hia. Por tanto, parece ser que estos compuestos efectivamente afectan al proceso de la desgranulación.

□

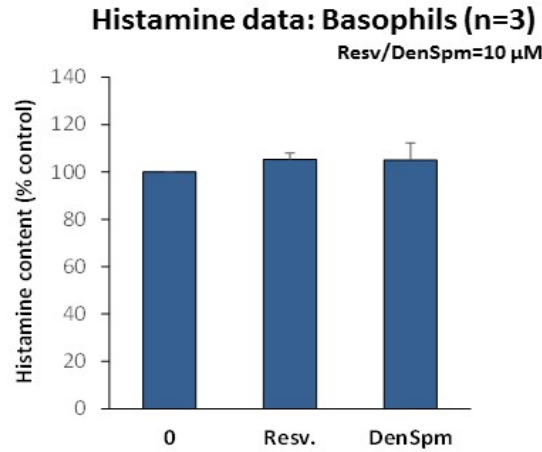


Figura 18. Contenido de Hia total (extracelular + intracelular) tras el tratamiento con resveratrol (Resv) y DENSPm 10 μ M en basófilos humanos purificados. Los resultados se expresan como porcentajes tomando como control basófilos no tratados, y son media \pm SD de 3 experimentos independientes.

Para comprobar si los resultados obtenidos en basófilos humanos eran reproducibles en una línea celular de mastocitos humanos, se realizó un ensayo similar al descrito anteriormente (Fig. 17) en la línea celular LAD2. Como resultado (Figura 19), se observó la misma tendencia que en los basófilos humanos purificados, en cuanto a los efectos inhibitorios de los dos compuestos en la liberación de Hia. Este resultado parece confirmar que la inhibición de ambos compuestos interfiere en el proceso de la desgranulación elicitada por IgE/anti-IgE.

□

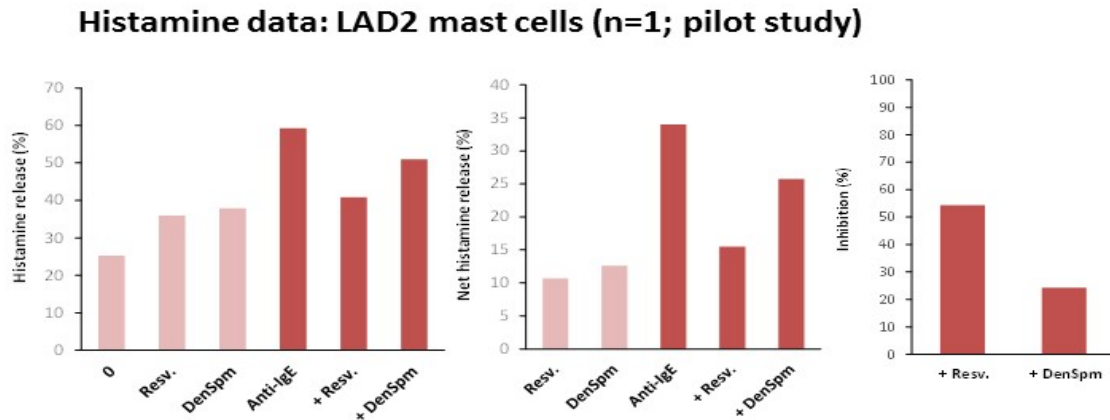


Figura 19. Liberación de Hia en la línea celular de mastocitos LAD2 en presencia y ausencia de resveratrol (Resv) y DENSPm 10 μ M, en condiciones de estimulación de la desgranulación con IgE/anti-IgE y sin ésta (liberación de Hia espontánea). Los resultados se expresan como como porcentajes de liberación de Hia (panel izquierdo), porcentajes de liberación de Hia neta (en relación a la liberada espontáneamente; panel central) y porcentajes de inhibición de la liberación de Hia respecto a células LAD2 estimuladas con IgE/anti-IgE pero no tratados (panel derecho).

Inmunodetección mediante Western-Blot de SSAT y proteínas relacionadas en basófilos humanos bajo distintos tratamientos

Una vez observado el fenómeno inhibitorio descrito en los ensayos de liberación de Hia, se planteó investigar el posible mecanismo molecular responsable del mismo. Como se ha mencionado anteriormente, resveratrol y DENSpm fueron seleccionados con el fin de provocar la sobreexpresión de SSAT, esto es, un aumento del catabolismo y, por tanto, una correspondiente disminución de los niveles de PA. Por ello, se determinaron los niveles de proteína de SSAT, así como de otras proteínas relacionadas con el metabolismo de la propia SSAT y de la 5-HT, mediante inmunodetección *Western-Blot*. Como resultado (Figura 20), se detectaron variaciones similares en los niveles de proteínas con ambos tratamientos. En el caso del resveratrol, los niveles de TPH1 (enzima clave en la síntesis de 5-HT) e HIF1 α (indicador de las variaciones de SSAT) disminuyeron de manera importante, mientras que muestran una tendencia similar en el proceso de la desgranulación elicitada por IgE/anti-IgE. Sin embargo, los niveles de proteína Nrf-2 (factor de transcripción asociado a cambios en la síntesis del mensajero de SSAT) parecen sufrir un incremento. Por otro lado, el tratamiento con DENSpm parece producir también una disminución de los niveles de TPH-1 e HIF1 α , mientras que los niveles de Nrf2 no varían significativamente. Desafortunadamente, no se pudo determinar por inmunodetección *Western-Blot* niveles de proteína suficiente de SSAT ni MITF (un factor de transcripción asociado a TPH1) para evaluar diferencias significativas a causa de los tratamientos. De manera resumida, existen indicios indirectos de que ambos compuestos alteran los niveles de SSAT, si bien no se ha podido demostrar en estos ensayos experimentales.

Determinación aminas biógenas mediante HPLC.

Por último, se intentó determinar mediante HPLC los niveles intra- y extracelulares de PA, Hia y 5-HT en basófilos humanos purificados no estimulados con IgE/anti-IgE (liberación de Hia espontánea), sin tratar y tratados con resveratrol y DENSpm. Desafortunadamente, no se detectó ninguna de las aminas biógenas intracelulares, muy posiblemente debido a un problema con la conservación de las muestras. Sin embargo, como se muestra en la Figura 21, en medios extracelulares sí se pudo observar que los niveles de Hia sufrían una disminución importante en células tratadas. Cabe destacar que, mientras que en el ensayo de liberación de Hia no se apreciaron diferencias significativas (Fig. 17), este método (más sensible que la espectrofluorometría directa de Hia) parece confirmar un proceso inhibitorio en la liberación de Hia, incluso de manera independiente al mecanismo elicitado por IgE/anti-IgE.

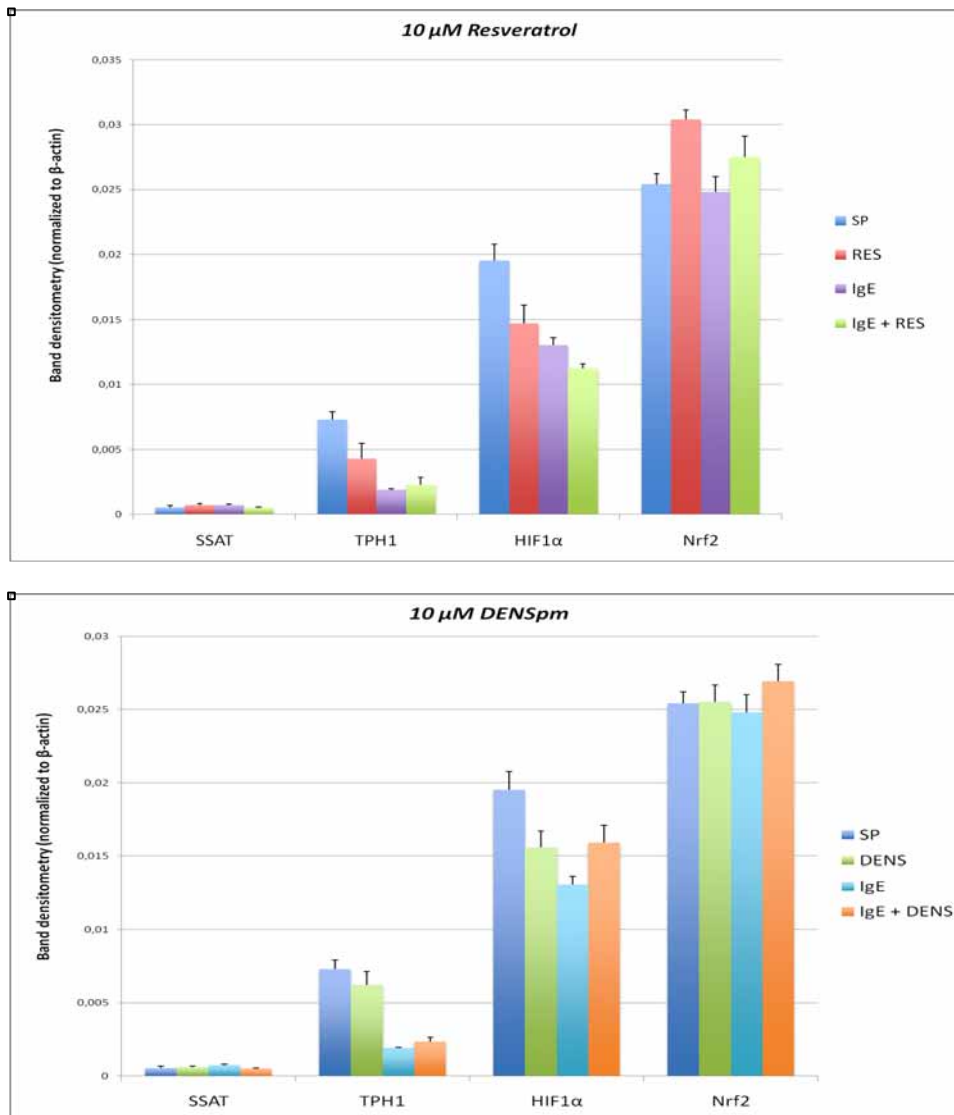


Figura 20. Densitometría correspondiente a las bandas inmunodetectadas mediante Western-Blot para SSAT, TPH1, HIF1 α y Nrf2 en basófilos humanos purificados bajo las siguientes condiciones: sin tratamiento (SP), resveratrol (RES) o DENSpm (DENS), IgE/anti-IgE (IgE) e IgE/anti-IgE + tratamiento (RES o DENS). La intensidad de las bandas está normalizada frente a los niveles de β -actina. Cada columna representa la media \pm SD de 3 experimentos independientes

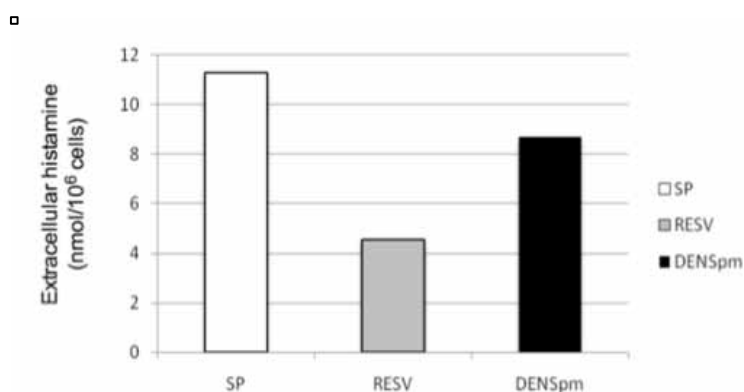


Figura 21. Niveles de Hia extracelular determinados mediante HPLC en basófilos humanos purificados sin tratar (SP) y tratados durante 2 h con resveratrol (RESV) y DENSpm 10 μ M. Los resultados se expresan como nmoles de Hia por millón de células.

DISCUSIÓN

En el capítulo II de la presente Tesis Doctoral, se ha pretendido estudiar el papel de las PA en mastocitos y basófilos humanos mediante una aproximación farmacológica. A partir de los fenómenos observados en el capítulo I, se decidió investigar si los resultados serían reproducibles en humanos. Dado que los BMMCs se obtuvieron a partir de ratones transgénicos, para solventar esta limitación experimental se propuso tratar farmacológicamente las células de estudio, a fin de imitar el fenotipo de los BMMCs, esto es, una disminución en los niveles de PA. A partir de este ensayo, se determinarían los efectos de esta disminución en los gránulos de los mastocitos y los basófilos humanos, estudiando cómo esto afecta al proceso de la desgranulación.

En relación con el metabolismo de las PA, se propuso que un aumento del catabolismo permitiría imitar el fenotipo mencionado en el capítulo I. Para ello, se eligió como diana la SSAT, encargada de catalizar la N¹-acetilación de los residuos de aminopropilo de Spd y Spm utilizando acetil-CoA como donador de grupos acetilo. Es, además, la enzima clave del catabolismo de las PA. Por tanto, cabría esperar que una sobreexpresión de SSAT llevase a la disminución de los niveles de PA, obteniéndose el fenotipo a investigar.

Para ello, se seleccionaron dos compuestos, con diferente especificidad de acción para SSAT. El primero, resveratrol, un polifenol natural presente en el vino tinto, los cacahuetes y las uvas (Siemann y Creasy, 1992; Sanders y cols., 2000). Se ha descrito que este compuesto tiene como diana la p38 MAPK y el factor de transcripción and PPAR γ , lo cual da lugar a un aumento de la actividad SSAT (Ulrich y cols., 2006). También se ha descrito que c-Fos podría tener que ver con una inhibición de la síntesis de PA, así como un aumento de su catabolismo (Wolter y cols., 2003).

Por otro lado, el segundo compuesto es N(1),N(11)-dietilnoespermina (DENSpm), una molécula artificial, análoga de la Spm, que es capaz de inducir SSAT. De manera más concreta, esta molécula es capaz de estabilizar el transcrito de SSAT de 17 a 64 horas. Asimismo, mientras que la SSAT tiene una vida media de aproximadamente 15 minutos, es capaz de estabilizar la proteína hasta 12 horas, produciendo una sobreexpresión de la misma entre 50 a 2000 veces (Pegg, 2008), siendo un perfecto candidato para los experimentos del capítulo II de la Tesis Doctoral.

En primer lugar, se determinaron las condiciones experimentales, más particularmente, las concentraciones para los ensayos con ambos compuestos. En ambos casos, la concentración seleccionada fue de 10 μ M, dado que esta concentración, sin ser muy elevada, era capaz de

producir una inhibición importante en la liberación de Hia. Además, estos resultados concuerdan con otros recientemente publicados de posibles efectos del resveratrol en la liberación elicitada en mastocitos y basófilos (Han y cols., 2013; Tanaka y cols., 2015). Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente de este proceso aún no se ha esclarecido.

De manera más amplia, se ensayaron diferentes condiciones de desgranulación elicitada por IgE en ambos compuestos a 10 μ M. La inhibición producida por el resveratrol sobre la desgranulación fue incluso del 80%, afectando probablemente en conjunto a la ruta de señalización para la liberación de los componentes de los gránulos. Este resultado hace pensar que es muy probable que no tenga una diana molecular única y, por tanto, la sobreexpresión de SSAT no sea la causa exclusiva del fenómeno observado. Incluso, una posible explicación sea que el resveratrol afecte en los pasos iniciales de la cascada de señalización. Más concretamente, se ha descrito que derivados de este compuesto son capaces de afectar a la fosforilación de Syk, la primera quinasa de esta vía intracelular (Jiang y cols., 2014). Existe, por tanto, la posibilidad de que un fenómeno similar esté sucediendo en los basófilos, explicando esto el alto grado de inhibición producido por el resveratrol.

Más sorprendente es el hecho de que el compuesto DENSPm sea capaz de producir inhibición del proceso de desgranulación. Si bien anteriormente se ha descrito la importancia de las PA en este proceso en BMMCs de ratón (García-Faroldi y cols., 2010), es la primera vez que se muestra que un análogo de las PA es capaz de producir estos efectos en basófilos humanos. Además, la especificidad de DENSPm en cuanto a su diana (SSAT, Wolter y cols., 2003) hace pensar que los niveles de PA estén necesariamente implicados en este grado de inhibición. Dado que no hay nada publicado acerca de las PA y los efectos en basófilos humanos, este es un campo nuevo por explorar.

Como ya se expuso en los resultados, se determinaron los niveles de Hia extracelular tras la liberación elicitada por IgE. En principio, los niveles extracelulares de Hia tras los tratamientos sin IgE no se vieron alterados significativamente. Sin embargo, sería un error pensar que una disminución en los niveles de Hia corresponde automáticamente a problemas en el mecanismo de liberación elicitada. Algunos autores ven discrepancias en este sentido, pues consideran la Hia un marcador fiable de la liberación independientemente de la actividad histidina descarboxilasa o de los niveles de Hia intracelulares (Kanerva y cols., 2009). Se propuso que hubiera sido interesante poder medir la actividad HDC en basófilos durante su desarrollo, no obstante, esto es inviable dado que los basófilos llegan ya maduros a la sangre periférica. Otra aproximación hubiera sido medir la actividad β -hexosaminidasa lisosomal, dado que es otro importante marcador del proceso de la desgranulación (Wernesson y Pejler, 2014). Desafortunadamente, no se disponían de los medios necesarios para la realización de esta medida. Para solventar esto, se determinaron los niveles totales de Hia sin y con tratamientos, y se observó que no existían diferencias significativas entre las tres condiciones. Por tanto, parece ser que los compuestos afectan al proceso de la desgranulación elicitada por IgE/anti-IgE.

Para comprobar si los resultados obtenidos eran reproducibles en mastocitos humanos, se utilizó la línea celular de mastocitos LAD2, la cual presenta el receptor Fc ϵ RI, por lo que estas células tienen la posibilidad de desgranular mediante estimulación con IgE (Kishenbaum y cols., 2003) además de citoquinas, Hia, triptasa y quimasa en sus gránulos. Se llevó a cabo el mismo ensayo que para basófilos humanos, y se obtuvieron resultados similares. Esto podría indicar que, a pesar de las diferencias en las funciones y la fisiología entre mastocitos y basófilos, así como el hecho de que una sea una línea celular establecida y los basófilos células extraídas directamente de pacientes, los mecanismos por los cuales ambos compuestos producen la inhibición parecen compartir similitudes.

En el intento de averiguar el posible mecanismo subyacente, la primera determinación a realizar es detectar niveles de SSAT. Si bien esta proteína está en muy bajos niveles en células no proliferativas (Pegg y cols., 2009), era esperable detectarse tras la inducción con ambos compuestos. Sin embargo, ha sido imposible detectar niveles de proteína SSAT en los *Western-Blot* ensayados. Una explicación plausible sería que el anticuerpo para SSAT se haya estropeado en el transporte (se transportó desde Málaga a Kent, para su uso), o bien, que este anticuerpo proporcionado por una casa comercial no funcione adecuadamente. En cualquier caso, se intentó determinar los niveles de HIF1 α , puesto que se ha descrito que presenta un comportamiento antagonista al de SSAT, esto es, los niveles de HIF1 α disminuyen cuando SSAT sube (Pegg, 2009). Como se ha descrito, los niveles de HIF1 α disminuyeron con los tratamientos, pudiendo indicar una sobreexpresión de SSAT. Por otro lado, observaciones previas en BMMCs han mostrado que una disminución en los niveles de PA estaban asociadas a una disminución de los niveles de 5-HT, así como de TPH-1 (Acosta-Andrade y cols., 2016). Con el objetivo de determinar si este fenotipo era reproducible en el modelo humano, se determinaron también los niveles de proteína TPH-1. Como resultado, se observa una disminución de estos niveles, lo cual podría indicar interacciones similares entre el metabolismo de las PA y de la 5-HT. Por último, se intentó determinar los niveles de proteína de los factores de transcripción Nrf-2 (asociado a la expresión de SSAT) y de MITF (asociado a la expresión de TPH-1) (Casero y Pegg, 2009; Ito y cols., 1998). Mientras que los niveles de MITF no fueron detectables mediante el anticuerpo utilizado, los niveles de Nrf2 mostraron una tendencia a aumentar tras los tratamientos, lo cual estaría en línea con la sobreexpresión de SSAT. Sin embargo, las diferencias observadas no fueron significativas.

Por último, se intentó determinar los niveles intracelulares de PA y aminas biógenas mediante HPLC, un método ampliamente usado en nuestro laboratorio (García-Faroldi y cols., 2010; Acosta-Andrade y cols., 2016), y que se ha descrito en el apartado de Material y Métodos. No obstante, no se pudieron detectar los niveles de PA ni 5-HT en basófilos humanos purificados, muy posiblemente debido a un problema de conservación de las muestras correspondientes. No obstante, es interesante señalar que, al tratarse de células diferenciadas no proliferativas, no sería extraño que los niveles de PA estén incluso por debajo del límite de detección del sistema. Por otra parte además, dado que la sobreexpresión de SSAT conllevaría una disminución de los niveles de PA, sería lógico pensar que en las condiciones de tratamiento tampoco serían observables. En cuanto a la 5-HT, existe controversia al respecto. En estudios en la década de 1980 se afirmaba que la 5-HT está presente en basófilos humanos (Fal y cols., 1985) mientras que estudios más recientes sostienen que éstos producen Hia, leucotrienos C, IL-4, e IL-13, pero no 5-HT (Tschopp y cols., 2006). En cualquier caso, es muy posible que estos niveles sean igualmente indetectables incluso por HPLC. Por otro lado, es interesante mencionar que, aunque por espectrofluorimetría directa no se apreciaron diferencias significativas en los basófilos tratados y sin tratar en cuanto a los niveles de liberación de Hia espontánea, esto sí pudo determinarse mediante HPLC, un método mucho más sensible (pues se derivatizan las aminas con cloruro de dansilo antes de su detección). Los resultados obtenidos muestran una disminución de la liberación espontánea con ambos compuestos, siendo más pronunciada esta inhibición con el resveratrol que con DENSpm. Por tanto, se observa el mismo patrón de inhibición que el observado tras la elicitación con IgE/anti-IgE. Este resultado podría indicar que los mecanismos moleculares afectados por los compuestos sean independientes de la vía de señalización IgE/anti-IgE.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran un patrón de inhibición presente tanto en mastocitos como en basófilos, que pudiera ser incluso independiente de IgE/anti-IgE. Por tanto, existe la posibilidad de que las interacciones PA-estructuras de membrana sean las que interfieren en este proceso. Futuros experimentos serán necesarios para esclarecer las interacciones moleculares que se producen en estos tipos celulares, y el papel de las PA en ellas.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resultados y discusión, Capítulo III: **Interacciones poliaminas-membranas-ARN: del** **pasado al futuro de la biología***

(*) Los resultados incluidos en este capítulo se han publicado en forma de artículo en la revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*: Acosta-Andrade C, Artetxe I, Lete MG, Monasterio BG, Ruiz-Mirazo K, Goñi FM, Sánchez-Jimenez F (2017) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* B 155: 173–181. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.005. Este artículo se adjunta en el Anexo III.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Interacciones poliaminas-membranas-ARN: del pasado al futuro de la biología

RESUMEN

Las poliaminas biogénicas (PA), esto es, espermina (Spm), espermidina (Spd) y putrescina (Put) son derivados aminoacídicos ampliamente distribuidos, presentes en todas las células vivientes a lo largo de la escala evolutiva. Sus grupos amino les confieren un marcado carácter básico al pH celular. Hemos testado la interacción de las PA con fosfolípidos cargados negativamente (PIP₂ entre ellos, abundante en la membrana nuclear) y con ácidos nucleicos (principalmente ARNt por razones prácticas). Las PA indujeron agregación de las vesículas lipídicas que contenían fosfolípidos ácidos y también de los ácidos nucleicos. La agregación se detectó utilizando métodos espectroscópicos y de microscopía de fluorescencia (estos últimos utilizando vesículas unilaminares gigantes). Los complejos PA-liposoma fueron desagregados parcialmente cuando se añadieron ácidos nucleicos a la mezcla, indicando una competición de los lípidos y los ácidos nucleicos por las PA, en un fenómeno de equilibrio múltiple. Observaciones similares se obtuvieron cuando las vesículas estaban compuestas de ácido oleico y 1-decanol (proporción 1:1) en lugar de liposomas de fosfolípidos. Los datos aquí presentados podrían evocar posibles procesos primitivos de la evolución prebiótica. En el otro extremo de la escala temporal, este sistema podría constituir una interesante herramienta en el desarrollo de distribución de fármacos a escala nanoscópica.



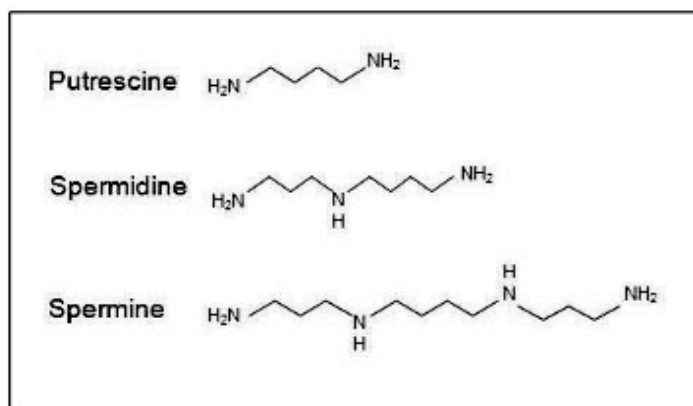
UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas biogénicas (PA) son derivados aminoácídicos sintetizados a partir de aminoácidos catiónicos. La diamina putrescina (Put) es sintetizada a partir de la arginina y/o la ornitina. Las PAs espermidina (Spd) y espermina (Spm) son sintetizadas mediante la adición de grupos aminopropilo (que provienen de la S-adenosil-metionina descarboxilada (dSAM)) a los dos grupos amino primarios de la Put (Fig. 22A). Spd y Spm son las PA más frecuentes sintetizadas en eucariotas. Asimismo, organismos no eucariotas, como Arqueas y Bacterias, pueden sintetizar también un amplio espectro de PA (Okada y cols., 2014; Hori y cols., 2016). En todos los organismos, la presencia de PA es esencial para la proliferación y supervivencia (Cohen, 1998). No obstante, los niveles de PA han de ser coordinados durante el estado proliferativo de las células, ya que un exceso de niveles intracelulares de PA puede ser deletéreo debido a la toxicidad de sus productos de degradación (Agostinelli y cols., 2015). La importancia de las PA en el crecimiento celular se refleja en el hecho de que el metabolismo de las PA es un sistema metabólico muy robusto (Fig. 22B) (Rodríguez-Caso y cols., 2006). La enzima clave de su síntesis, la ornitina descarboxilasa (ODC) es una de las proteínas eucarióticas con menor vida media (en el orden de minutos) debido a su regulación post-traducciona l regulada por las familias de antizima (AZ) e inhibidor de antizima (AZIN) (Ramos-Molina y cols., 2015; Acosta-Andrade y cols., 2016). El carácter esencial de las PA para la vida se explica principalmente por su capacidad de unión a polianiones macromoleculares, lo cual induce cambios conformacionales tanto en el ADN como en el ARN. De hecho, la fidelidad y tasa tanto de la síntesis de ácidos nucleicos como de proteínas se ven afectadas positivamente por la disponibilidad de PA (Igarashi y Kashiwagi, 2010). Numerosos estudios biofísicos han descrito las disposiciones más probables de interacción de la Spd y Spm con ADN genómico, o fragmentos de ADN de diferentes longitudes y secuencias (Cohen, 1998; Basu y cols., 1996; Ruiz-Chica y cols., 2001, 2003). Una revisión exhaustiva de los estudios biofísicos acerca de las interacciones PA-ARN y sus consecuencias funcionales se ha publicado recientemente (Lightfoot y Hall, 2014).

Otros polianiones presentes en todas las células vivas podrían ser también interactores de las PA. Esto incluye fosfolípidos polianiónicos de membrana y compuestos estructurales relacionados. Se han descrito numerosos indicios biofísicos de interacciones PA-lípidos (Schuber y cols., 1983). La unión de PA catiónicas a lípidos de membrana cargados negativamente parecen ser llevadas a cabo por interacciones electrostáticas y contribuciones hidrofóbicas adicionales (Lete y cols., 2014; Finger y cols., 2014). Asimismo, elementos relacionados con las PA pueden ser importantes moduladores de estructuras de membrana y su dinámica. El progreso en la caracterización de las bases moleculares de las interacciones de las PA con las membranas biológicas es de gran interés en muchas áreas científicas y biotecnológicas, como por ejemplo en funciones inflamatorias o neuroendocrinas (Kanerva y cols., 2009), mecanismos de señalización (Coburn, 2009), incluidos aquellos involucrados en la promoción y progresión del cáncer (Gilmour, 2007; Ruiz-Perez y cols., 2015), el desarrollo de terapias basadas en PA (Chen y cols., 2006) o estudios en virología (Ackermann y Prangishvili, 2012).

□
A



B

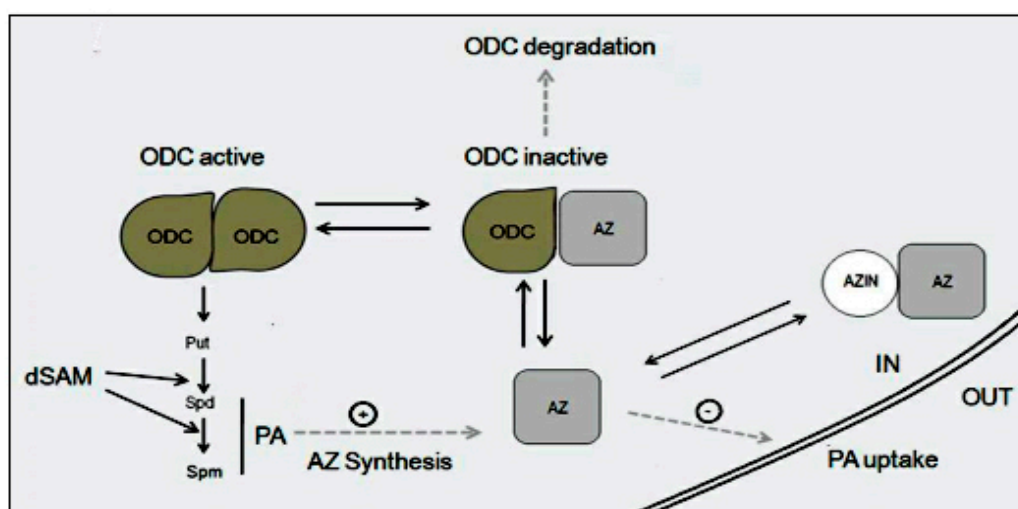


Figura 22. (A) Estructuras moleculares de las PA derivadas de la ornitina. (B) Mecanismo de regulación de la síntesis e incorporación de PA. Putrescina (Put) Espermidina (Spd) Espermina (Spm) S-adenosilmetionina descarboxilada (dSAM), Ornitina descarboxilasa (ODC), Antizima (AZ) y Inhibidor de Antizima (AZIN)

La idea de un “mundo ARN” en las primeras etapas de la vida está ampliamente aceptada hoy día, sin embargo, las bases moleculares de su aparición y evolución merecen ser enriquecidas en el contexto de sistemas similares a protocélulas compuestos de precursores lipídicos y otras moléculas orgánicas primitivas (Ruiz-Mirazo y cols., 2014). La vida pudo empezar cuando, bajo condiciones azarosas pero termodinámicamente favorables, las moléculas de ARN comenzaron una ruta evolutiva que dio lugar al último ancestro común universal (*last universal common ancestor*, LUCA). Sin embargo, esta hipótesis se enfrenta al problema de las interacciones electrostáticas. Dado que tanto ácidos nucleicos como ácidos grasos primitivos estaban muy probablemente cargados negativamente... ¿Cómo pudieron conformarse las estructuras protocelulares si estos eventos no estaban favorecidos energéticamente? ¿Qué tipo de molécula catiónica pudo ayudar en este proceso? En este sentido, un posible papel de las PA en el ambiente primitivo prebiótico ha sido recientemente mencionado, siendo las PA teóricamente postuladas como "Moléculas e Iones Simples Universales" (*Simple Universal Molecules and Ions*, SUMIs), esto es, moléculas e iones que originalmente constituyeron las protocélulas. En línea con esto, las PA se propusieron como clave en algunos procesos importantes, como constituir una fuente de nitrógeno, o incluso ser estructuras estabilizadoras catiónicas importantes (Norris y cols., 2014). Bajo este supuesto, los ácidos nucleicos, las

vesículas lipídicas y las PA podrían haber interactuado en el principio de la vida como parte de un mecanismo termodinámicamente dirigido a ayudar a la formación de LUCA.

En el presente trabajo, se intentó complementar el conocimiento previo sobre las interacciones PA-ácidos nucleicos con nuevos resultados biofísicos experimentales de interacciones PA-lípidos en presencia y ausencia de ácidos nucleicos.

RESULTADOS

Agregación de vesículas

Se exploró la posibilidad de que las PA pudieran inducir agregación de vesículas como indicativo de interacciones PA-lípidos. En este ensayo, la turbidez de la muestra (absorbancia a 400 nm) se incrementa cuando el compuesto añadido es capaz de interactuar con al menos 2 vesículas diferentes, por tanto, induciendo la agregación de liposomas (Goñi y cols., 2003). Las vesículas usadas experimentalmente contenían fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP_2), un fosfolípido con ≈ 4 cargas negativas a pH 7.4 (Koojiman y cols., 2009)(Fig. 23A). La Spm causó una importante agregación de vesículas mientras que un efecto menor fue causado por la Spd, y no se detectó agregación al utilizar Put, ni siquiera a concentraciones que duplican las de la Spm. Por tanto, la Spm fue elegida como la PA más adecuada para realizar los siguientes experimentos. A partir de los resultados mostrados en la Fig. 23B, se seleccionó 1 mM de Spm como concentración experimental para los ensayos de agregación.

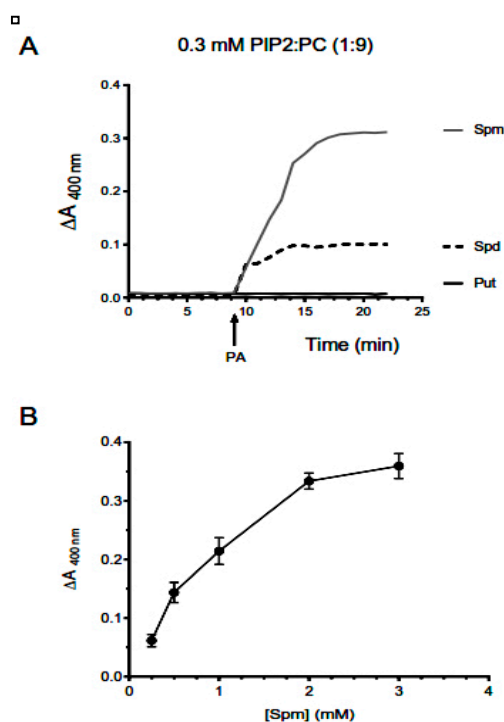


Figura 23. (A) Cinética representativa de la agregación inducida por 4 mM Put, 3 mM Spd y 2 mM Spm en vesículas SUV 0.3 mM $\text{PIP}_2\text{:PC}$ (1:9). (B) Concentraciones crecientes de Spm fueron añadidas a una concentración fija de SUV 0.3 mM $\text{PIP}_2\text{:PC}$ (2:8). Cada punto representa la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

Experimentos de agregación similares fueron monitorizados utilizando como componentes lipídicos cargados negativamente PIP [3 cargas negativas bajo nuestras condiciones experimentales (van Paridos y cols., 1986)] o PI (1 carga negativa). El PIP posee la misma estructura molecular del PIP₂, siendo menor su número de cargas negativas (3 en lugar de 4). No se observó una agregación significativa cuando se reemplazó PIP₂ por PIP en las vesículas PIP:PC (1:9) (datos no mostrados). Sin embargo, se pudo observar agregación inducida por Spm cuando se incrementó el porcentaje de PIP en la bicapa lipídica (PIP:PC = 2:8) (Fig. 24A). No obstante, no se pudo detectar agregación ni para las vesículas de composición PI:PC (2:8) ni para aquellas compuestas de 100% PC, que sirvieron de control negativo.

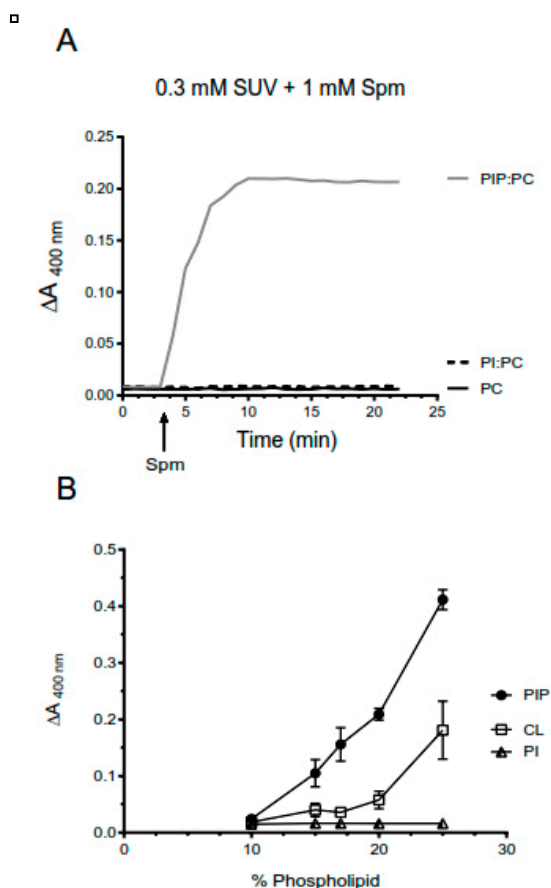


Figura 24. Estado de agregación de SUV, medido como cambios en la turbidez inducidos por Spm. (A) Cinética representativa de agregación inducida por 1 mM Spm en liposomas SUV de composición PIP:PC, (2:8), PI:PC(2:8) y PC 100%. La concentración total de lípido fue de 0.3 mM. (B) Efecto en el estado de agregación, provocado por 1 mM Spm, cuando se incrementan las concentraciones de fosfolípidos en vesículas SUV con las composiciones PIP:PC, CL:PC o PI:PC. Cada punto representa la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

A continuación, se investigaron las interacciones de la Spm con vesículas compuestas por fosfolípidos con diferente estructura. Manteniendo las condiciones experimentales, se observó agregación inducida por Spm tanto en vesículas compuestas por PIP:PC como para cardiolipina (CL:PC). En este caso, se produjo una agregación mayor para aquellas vesículas formadas con PIP que con CL, en línea con la diferencia de cargas entre ambos fosfolípidos (≈ 2 cargas negativas en nuestras condiciones experimentales)(Koojiman y cols., 2016). Más específicamente, se determinó que la agregación inducida por Spm obtenida en SUV de composición PIP:PC (17.5:82.5) fue similar a la obtenida para SUV de composición CL:PC (25:75) (Fig. 24B). Para los siguientes experimentos, PIP fue seleccionado (en lugar de PIP₂)

debido a su alta proporción en la envoltura nuclear (20% frente a 11%) (Byrne y cols., 2007). El núcleo es, además, un escenario donde todos los posibles interactores están presentes. Por ello, la composición de SUV PIP:PC (17.5:82.5), así como 1 mM de Spm, fueron seleccionados como las concentraciones estándar para los siguientes experimentos.

Con el fin de investigar las consecuencias estructurales de las interacciones electrostáticas entre los fosfolípidos y las PA, se determinaron los efectos de la Spm en la curvatura de liposomas. Ya ha sido descrito previamente que las PA podrían modificar de manera efectiva los bordes de las bicapas lipídicas (Ohki, 2012) e inducir curvatura en membranas lipídicas (Meers y cols., 1986). Para ello, se diseñaron experimentos con vesículas de dos tamaños diferentes (y, por tanto, diferente grado de curvatura), como son SUV y LUV, manteniendo las mismas composiciones lipídicas y la concentración de Spm. El diámetro de los SUV es aproximadamente de 30 nm, mientras que el diámetro de los LUV es cercano a los 100 nm. Tal y como puede observarse en la Fig. 25, ambas suspensiones de liposomas aumentaron el estado de agregación del sistema, siendo esta más evidente en LUV que en SUV.

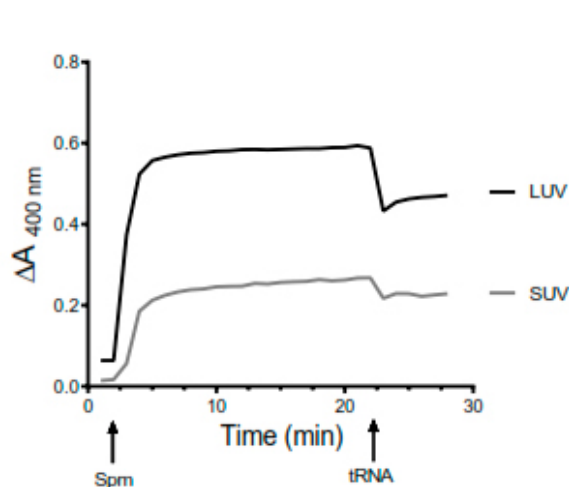


Figura 25. Cinética representativa de la agregación inducida por 1 mM de Spm en liposomas SUV y LUV de composición PIP:PC (17.5:82.5), y el posterior efecto en el estado de agregación tras añadir 3 mM ARNt al ensayo.

Interacción con ácidos nucleicos.

Con el propósito de testar las posibles interacciones simultáneas de las PA tanto con los liposomas como con los ácidos nucleicos, se añadieron ácidos nucleicos en el ensayo de agregación de vesículas. Inicialmente, se seleccionó ADN de levaduras para este cometido, al igual que en estudios previos (Lete y cols., 2014). Debido a la cantidad limitada de policondicionales en el ensayo, la presencia simultánea de dos ligandos independientes debería dar lugar a una competencia entre los mismos, causando una disminución en la turbidez, esto es, del número de interacciones Spm-vesícula.

Sin embargo, dado que el ensayo de agregación es un método indirecto basado en cambios en la turbidez, no podemos descartar algunas interferencias debido a los agregados formados por las PA con los ácidos nucleicos, sin la participación de liposomas. Para investigar esta posibilidad, se llevó a cabo un ensayo utilizando Spm y ácidos nucleicos, en este caso ARNt o ADN genómico, en ausencia de liposomas..

Tal y como se había observado anteriormente por métodos biofísicos alternativos (Ruiz-Chica y cols., 2001), se observó agregación en los complejos Spm-ADN, mientras una

mínima agregación no significativa se detectó en los complejos Spm-ARNt en las condiciones experimentales ensayadas (Fig. 26A). Por tanto, el ARNt fue seleccionado para los siguientes experimentos.

Trabajando con complejos Spm-liposomas, la disminución de agregación inducida por la adición de ARNt, mostró una correlación dosis-dependiente respecto a la concentración de ARNt (Fig. 26B). Finalmente, la concentración 3 mM de ARNt fue seleccionada como polianion competitivo en los siguientes experimentos. En la figura 3 se mostraba un aumento de la agregación de SUV y LUV tras añadir 1 mM, sin embargo, este estado de agregación del sistema se reduce en un 18 y 23%, respectivamente, al añadir ARNt. Este resultado sugiere interacciones formando un tripartito Spm-liposoma-ARNt, de alguna manera dependiente de la curvatura de las membranas de las vesículas (SUV>LUV).

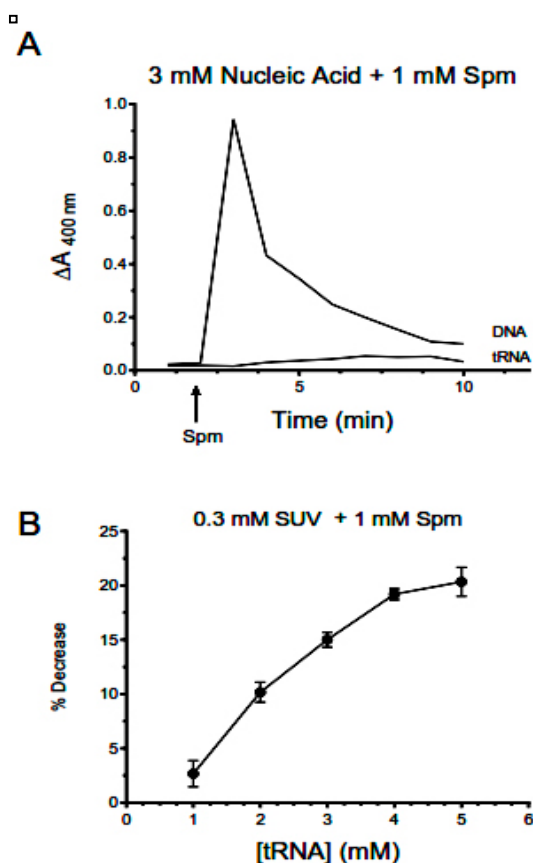


Figura 26. (A) Cinética representativa de la agregación inducida por 1 mM Spm y 3 mM de ácidos nucleicos para determinar el “background” de absorbancia producido por el ADN/ARNt en ausencia de liposomas en las condiciones experimentales. (B) Efecto de la concentración de ARNt en el descenso de la turbidez observado en experimentos realizados con vesículas SUV de composición PIP: PC (17.5:82.5) tras haber agregado al añadir 1 mM de Spm. Cada punto representa la media \pm error estándar de tres experimentos independientes.

Por otra parte, es bien conocido el hecho de que el Mg^{2+} es un catión capaz de interactuar con polinucleótidos. Por tanto, existe la posibilidad de que estas interacciones, en un ambiente prebiótico, pudieran verse favorecidas o interferidas en presencia de este catión. Para validar o descartar esta hipótesis, se repitieron los experimentos realizados previamente en presencia de 1 mM $MgCl_2$, esto es, unas dos veces la concentración fisiológica intracelular del catión libre. Tal y como se muestra en la Figura 27, no se apreciaron diferencias importantes. En las vesículas formadas por PIP las diferencias no fueron significativas (test t de Student, $n=3$) en el caso de los SUV, mientras que para los LUV las diferencias sí fueron significativas, aunque muy pequeñas. En presencia de Mg^{2+} , el incremento de turbidez inducido por Spm en los LUV fue del $13 \pm 4.4\%$ mayor que en ausencia de este catión ($p<0.0001$). Asimismo, se observa un descenso similar en la turbidez al añadir ARNt en ambos casos, con y sin Mg^{2+} . Por otra parte, este catión divalente no tiene mayor influencia en los cambios de turbidez de vesículas compuestas por PI (Fig. 27).

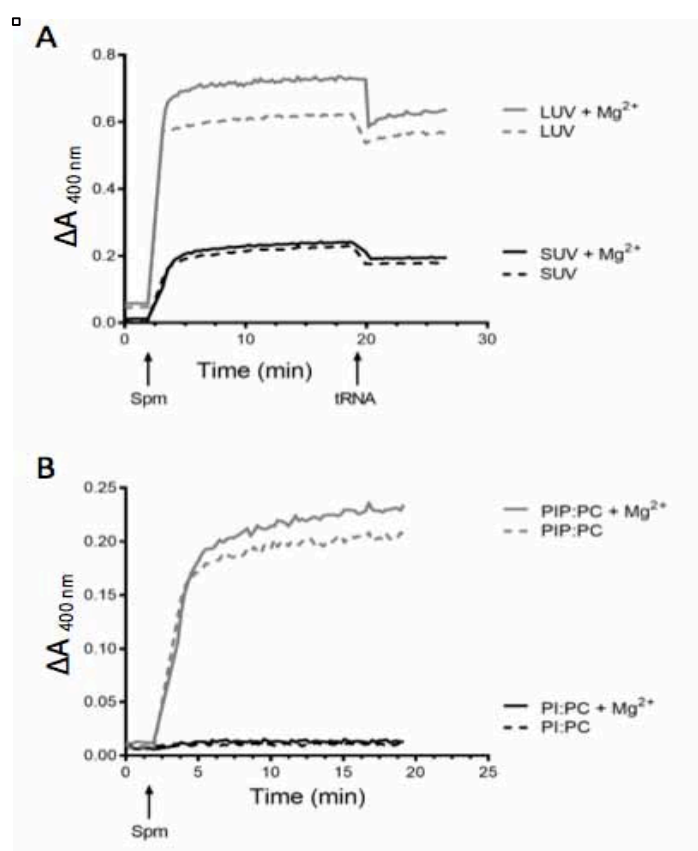


Figura 27. Efecto de 1 mM Mg^{2+} en la agregación inducida por Spm, medido como cambios en la turbidez de la suspensión de vesículas (ΔA). (A) Cinética representativa de la agregación producida tras añadir 1 mM Spm a vesículas SUV o LUV (PIP:PC 17.5:82.5), y el posterior efecto de la adición de 3 mM ARNt. (B) Cinética representativa de la agregación producida tras añadir 1 mM Spm a vesículas SUV formadas por PIP:PC (2:8) o PI:PC (2:8). La concentración de lípidos total fue de 0.3 mM.

Microscopía confocal

Con el objetivo de validar los resultados de los ensayos de agregación mediante una aproximación independiente, se llevaron a cabo ensayos que permitieran visualizar las consecuencias estructurales de las interacciones Spm-liposomas-ARNt. Para este propósito, se desarrollaron GUV (en lugar de SUV y LUV para una mejor observación de los fenómenos) utilizando una composición lipídica PIP:PC (2:8). Estas vesículas fueron marcadas con una sonda fluorescence con rodamina (*fluorescent* Rho-PE) para su visualización en el microscopio confocal. Vesículas compuestas sólo por PC fueron usadas como control. Los GUV se trataron con Spm durante 1 hora. Tras esto, se trataron los GUV con 10 mM de ARNt. Antes, durante y después de los tratamientos, los GUV fueron visualizados bajo el microscopio confocal por fluorescencia, y documentados sistemáticamente. Como se esperaba, los GUV compuestos de 100% PC no presentaron cambios significativos cuando se añadió la Spm (Figura 28). Por otro lado, las vesículas formadas por PIP:PC (2:8) mostraron un claro proceso de agregación y modificación de sus bordes (aplastamiento), modificando los GUV su forma de esférica a poliédrica. Estos efectos fueron revertidos parcialmente mediante la adición de ARNt (Fig. 29, paneles A, B y C).

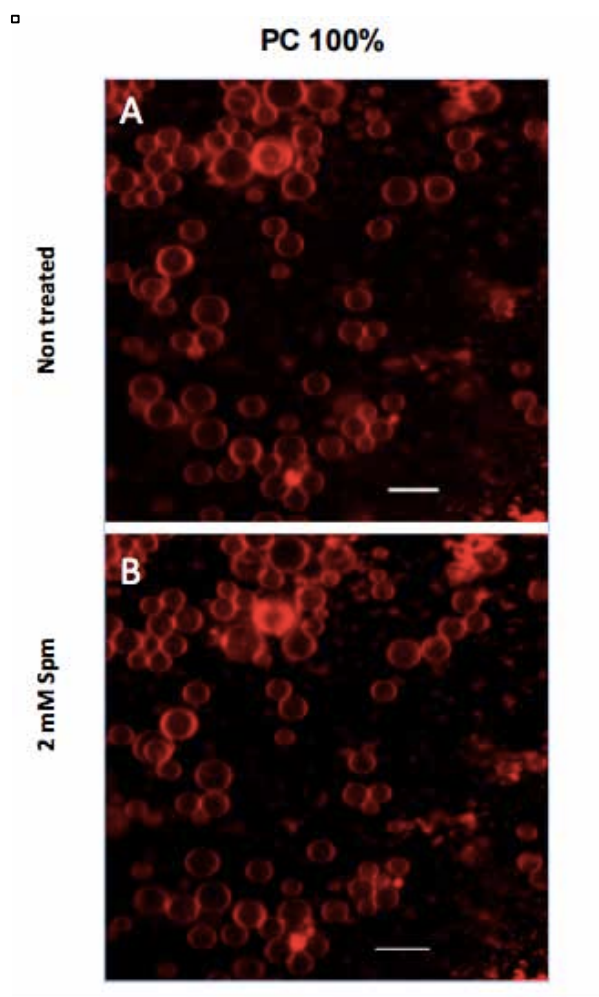


Figura 28. Imágenes de microscopía confocal representativas de GUV sin tratar (A) y su respuesta tras tratamiento con 2 mM Spm (B). Las membranas fueron marcadas utilizando Rho-PE. La composición se indica arriba. Los tratamientos se indican a la izquierda.. Barras de escala: 20 μ m.

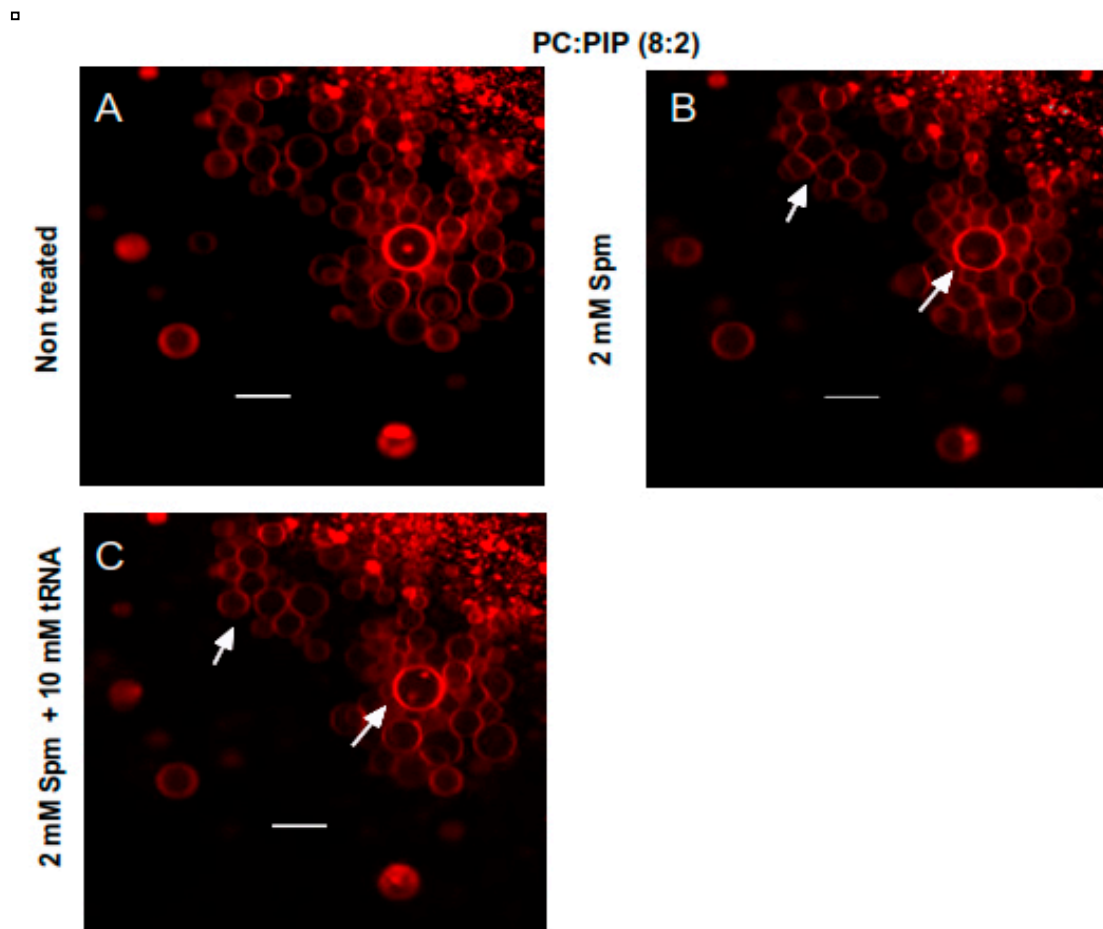


Figura 29. Imágenes de microscopía confocal representativas de *GUV* sin tratar (A) y su respuesta tras tratamiento con 2 mM *Spm* (B), y posteriormente con 10 mM *tRNA* (C). Las membranas fueron marcadas utilizando Rho-PE. La composición se indica arriba. Los tratamientos se indican a la izquierda. Las flechas blancas indican los cambios observados. Barras de escala: 20 μ m.

Agregación de vesículas formadas por ácido-oleico y 1-Decanol.

Los resultados anteriores indican interacciones espontáneas de un tripartito entre vesículas lipídicas aniónicas, PA y polinucleótidos que podrían ser importantes durante la era protocelular. Si bien tanto las PA como ARN de estructura secundaria podían haber estado presentes en un ambiente prebiótico, es difícil de imaginar que los fosfoinosítidos u otros lípidos complejos fueran componentes de las vesículas lipídicas en ese momento. Por ello, se realizaron experimentos con cadenas simples alifáticas con algún grado de oxidación, esto es, estructuras mucho más sencillas. Recientemente se ha descrito un protocolo muy efectivo para producir vesículas de ácido oleico (OA) mezcladas con alquenos y alcoholes cortos como 1-decanol (Rendón y cols., 2012).

Con el fin de explorar la posibilidad de utilizar las vesículas más simples y óptimas en un ambiente prebiótico, se prepararon vesículas con concentraciones finales de 0.1 y 0.3 mM OA:1-Decanol a un ratio molar 1:1. Se realizaron ensayos de agregación, y se observó un claro aumento en el estado de agregación del sistema utilizando vesículas 0.1 mM OA:1-decanol (1:1) y 1 mM Spm (Fig. 30). Este resultado es del orden de magnitud de los experimentos mencionados anteriormente con vesículas PIP:PC (17,5:82,5). A continuación, se añadió ARNt 3mM a los complejos Spm-OA:1-decanol agregados, para investigar la interacción y/o competición de los tres elementos. Bajo estas condiciones, el estado de agregación disminuyó un 35%, lo cual sugiere un desplazamiento del sistema Spm-vesículas hacia interacciones formando un tripartito.

□

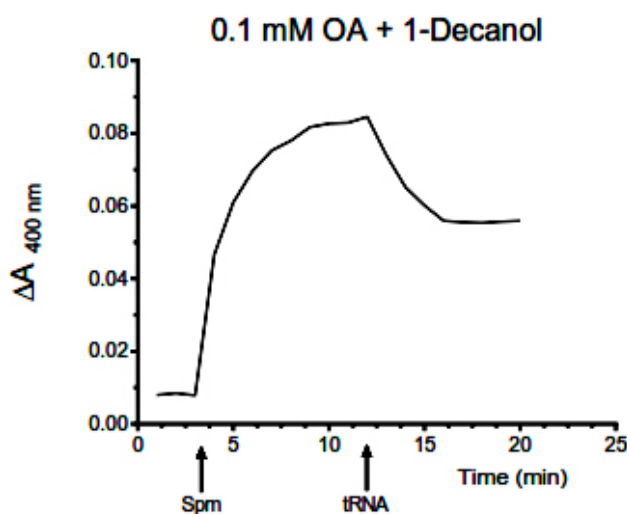


Figura 30. Cinética representativa de la agregación inducida por 1 mM Spm en vesículas formadas por 0.1 mM de Ácido oleico:1-Decanol (5:5), y el posterior efecto provocado por la adición de 3 mM ARNt.

DISCUSIÓN

En el capítulo III de la presente Tesis Doctoral, la principal observación es la interacción de las PA con bicapas lipídicas cargadas negativamente, y la competición existente entre los lípidos y los ácidos nucleicos por interactuar con las PA cuando estos tres elementos coexisten en suspensiones acuosas. Cada uno de ellos requiere una discusión aparte, con el fin de poder explicar adecuadamente el significado fisiológico de estos datos. Cabe destacar que, si bien las interacciones entre las PA y cada uno de estos elementos ya han sido estudiadas con anterioridad, nunca antes se le ha dado importancia a la existencia de un conjunto de interacciones entre 3 elementos, siendo esto clave para el entendimiento de los procesos biológicos en su conjunto.

Lípidos cargados negativamente

Con el fin de encontrar una composición lipídica apropiada para estudiar las interacciones PA-membrana, inicialmente se eligieron liposomas compuestos por polifosfoinosítidos, debido a que anteriormente se ha descrito que las vesículas formadas por PI, PIP y PIP2 son capaces de interferir en la formación de complejos entre la Spm y heparin-sesfarosa (Tadolini y Varani, 1986), así como estos lípidos están muy presentes en la membrana nuclear (Byrne y cols., 2007). Además de la Spm, se han descrito otros elementos relacionados con las PA (ODC y AZ) localizados también en el núcleo de células en proliferación y desarrollo (Rioux-Leclercq y cols., 2004; Murai y cols., 2009; Murakami y cols., 2010). En un principio fue utilizada una composición lipídica PIP2:PC (1:9), dado que PIP2 presenta 4 cargas negativas, esto es, posee el centro nucleófilo más fuerte de los fosfolípidos mencionados anteriormente.

Con respecto a las PA, se ha propuesto que su concentración intracelular debe estar en el orden de mM en células en proliferación (Sarhan y Seiler, 1989), en su gran mayoría asociadas a estructuras macromoleculares (Bardocz y White, 1998; Casero y Marton, 2007, Bercovich y cols., 2011). Los resultados mostraron que en el rango milimolar, tanto Spm como Spd (Spm>Spd) pero no la diamina Put, fueron capaces de inducir agregación en vesículas lipídicas (Fig. 23A). Por tanto, tanto el número de cargas positivas aportadas por las PA como la distancia entre ellas podrían contribuir a las diferencias observadas entre las aminas en los ensayos de agregación con liposomas. En este sentido, la distancia entre los átomos de nitrógeno de los grupos aminoterminales para Spm, Put y Spd está en torno a de 6,3 Å (Put), 11,3 Å (Spd) y 16,3 Å (Spm), tal y como se ha calculado por diferentes métodos y grupos independientes (Ruiz-Chica y cols., 2001; Marques y Bautista de Carvalho, 2000; Marques, comunicación personal). Estos resultados concuerdan con trabajos previos que indican que el número de aminas cargadas es un factor esencial para las interacciones PA-vesículas lipídicas (Finger y cols., 2014). Asimismo, es interesante destacar que ambas características estructurales, es decir, el número de cargas positivas y la distancia entre ellas, han sido referidas como muy importantes en cuanto a la capacidad de inducir cambios conformacionales en el ADN por parte de las PA (Ruiz-Chica y cols., 2001; Franceschin y cols., 2008).

Tras comparar los resultados obtenidos al usar vesículas compuestas por PIP2, PIP y CL (Fig. 23A, 24A y 24B), se puede argumentar que también en el caso de los fosfolípidos, ambos factores (número de cargas y distancia entre ellas) contribuyen a la capacidad de agregación inducida por Spm. Por ello, un mínimo de 2 cargas negativas sería necesario en los fosfolípidos de las vesículas para hacer posible la agregación inducida por Spm, al menos en nuestro modelo. Puede suceder también que, al menos parcialmente, la distancia entre las cargas negativas en las vesículas compuestas de PIP:PC respecto a la disposición de las cargas positivas de las PA pueda contribuir al estado de agregación del sistema (Koojiman y cols., 2016; Amburgey y cols., 1994; Olofsson y Sparr, 2013; Lupyan y cols., 2010). En cualquier caso, el hecho de que también se produzcan fenómenos de agregación en vesículas compuestas

con CL es significativo, ya que CL está presente principalmente en bacterias y en la membrana mitocondrial interna (Sohlenkamp y Geiger, 2016; Joshi y cols., 2016). Es también un dato interesante que el grado de agregación obtenido al añadir 1 mM de Spm para las vesículas PIP:PC (17.5:82.5) fue similar al de las vesículas compuestas por CL:PC (25:75) (Fig. 3B). Si se comparan estos experimentos, el ratio CL/PIP es ≈ 1.4 , muy próximo al ratio de cargas PIP/CL = 1.5. Esto es, en ambos casos el producto de la carga por la concentración es aproximadamente el mismo. Esto nos permite especular sobre la posible concurrencia de este tipo de interacciones en organismos procariotas y en mitocondrias. De hecho, las PA se han descrito como reguladores de numerosas funciones mitocondriales, tales como transporte de solutos al interior mitocondria, transiciones de permeabilidad, actividad ATP sintasa, tirosín quinasa y fosfatasa, y la apoptosis (Grancara y cols., 2015), aunque las bases moleculares para estas observaciones no están aún totalmente caracterizadas.

Los efectos de las PA provocados por su interacción con las membranas lipídicas pueden ser relacionados con múltiples papeles asignados a las PA en el metabolismo y señalización celular en estructuras membranosas (García-Faroldi y cols., 2010). Los fosfoinositolfosfatos han sido relacionados con la regulación de las tirosín quinasa como AKT, y consecuentemente, con el equilibrio de vida/muerte celular (Vivanco y Sawyers, 2002). El papel de las PA en este equilibrio ha sido extensamente referido. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las PA y el metabolismo glucídico están coordinados mediante AKT/GSK-3 β en células de neuroblastoma (Ruiz-Perez y cols., 2015), siendo este efecto crítico en la proliferación de neuroblastoma y su prognosis (Saulnier-Sholler y cols., 2015). Es posible pensar que las estructuras membranosas en el citosol parecen ser un escenario activo para las acciones de las PA. En estas estructuras se encuentra, como se mencionó previamente, AZ, un elemento regulador de ODC, que ha sido descrito como un sensor de PA (Kurian y cols., 2011) así como un regulador del transporte de PA (Kahana, 2009; Ramos-Molina y cols., 2015). Asimismo, es destacable el hecho de que la incorporación de PA ocurre, al menos parcialmente, por endocitosis, lo cual involucra procesos relacionados con compartimentos membranosos (Poulin y cols., 2012). Todos estos antecedentes sugieren que los efectos descritos arriba podrían tomar parte en un mecanismo regulador aún no caracterizado entre la síntesis de PA y su incorporación con el fin de mantener estables los niveles intracelulares PA. Por esto, el conocimiento acerca del metabolismo de las PA ha sido considerado como diana en estrategias antiproliferativas. Un ejemplo de esto son estructuras artificiales sintetizadas *in vitro* similares a las PA con múltiples grupos amino secundarios (>4), las cuales han demostrado ser muy eficientes como inhibidores de la incorporación de PA exógenas (Grossi y cols., 2016).

Competencia lípidos-ácidos nucleicos

Es importante recalcar el hecho de que la adición de ARNt a los complejos PA-LUV y PA-SUV produjo una reversión parcial de los efectos observados, siendo estos más evidentes en LUV (Fig. 25). Este resultado indica claramente que existe una competencia entre ambos interactores de la Spm. Asimismo, estos experimentos fueron validados mediante visualización de cambios en la curvatura de vesículas mediante microscopía confocal. En estos ensayos se utilizó un tipo de liposoma de mayor diámetro (GUV) debido a las limitaciones de la microscopía óptica en cuanto a resolución en partículas pequeñas. Bajo estas condiciones, fuimos capaces de documentar que la adición de Spm promovió una intensa agregación, además de convergencia en los bordes de las vesículas, llegando a establecerse superficies planas. De nuevo, estos efectos se revertieron parcialmente cuando se añadió ARNt en el ensayo (Fig. 29).

Por otro lado, el Mg²⁺ es uno de los cationes más abundantes en el citosol, donde suele estar a una concentración de aproximadamente 0.5 mM (como ión libre). Se conoce ampliamente la unión de alta afinidad del Mg²⁺ a los grupos fosfato de los (poli)nucleótidos. Debido a su posible interferencia, positiva o negativa, con las interacciones PA-lípidos, la mayoría de estos resultados se repitieron en presencia de 1 mM MgCl₂. Finalmente, sólo pudo detectarse un leve efecto positivo, lo cual sugiere que el Mg²⁺ no ejerce un papel principal en el

posible equilibrio múltiple PA-lípidos-ácidos nucleicos. Los efectos del Ca^{2+} y el Mg^{2+} en la ionización del PIP_2 se han estudiado en detalle previamente (Graber y cols., 2014; Wang y cols., 2016). Ambos cationes son capaces de promover un incremento de la ionización en la cabeza polar del fosfolípido, lo cual podría estar en línea con el leve incremento observado en las interacciones PA-lípidos en presencia de Mg^{2+} (Fig. 27). Si bien este catión es uno de los componentes de la “sopa primordial”, aparentemente su afinidad por los fosfolípidos cargados negativamente no es suficiente para provocar interferencias importantes en este equilibrio múltiple. Sería necesario un estudio cuantitativo de las interacciones fosfolípido- Mg^{2+} para determinar la validez de estas interpretaciones provisionales.

Relevancia biológica

Estos resultados indicaron la posibilidad de que interacciones espontáneas similares pudieran tener lugar en el proceso conducente a la formación de LUCA. Con el fin de reforzar esta hipótesis, se prepararon vesículas compuestas de moléculas “más primitivas”, dado de que es improbable que fosfolípidos complejos estuviesen presentes antes de la formación de la primera célula. Sin embargo, es bastante más probable que cadenas alifáticas con distintos grados de oxidación (por ejemplo, OA y 1-decanol), así como PA y ribonucleótidos estuvieran presentes en la sopa primordial de la vida (Norris y cols., 2014; Rendón y cols., 2012; Budin y cols., 2014; Burton y cols., 2012; Meierhenrich y cols., 2004; Powner y cols., 2009). Se llevaron a cabo los experimentos utilizando vesículas con composición 0.3 mM OA:1-decanol, pero sorprendentemente se observó un excesivo grado de agregación inducida por Spm. Esto nos llevó a disminuir la concentración final de lípidos a 0.1 mM. (Fig. 30). Además, ha de tenerse en cuenta que los experimentos se realizaron en tampón bicina a pH 8.2, tal y como se describe en (Rendón y cols., 2012), por lo que la Spm es capaz de interactuar de manera eficiente con este tipo de vesículas utilizando solamente 3 cargas positivas, debido a que el pKa del cuarto grupo amino es de 7.9. En resumen, la concurrencia de interacciones en un tripartito entre las PA con “vesículas primitivas” y ARNt puede ser claramente deducidas de los resultados mostrados en la Fig. 30. Los resultados mostrados en el capítulo 3 de la presente Tesis Doctoral demuestran que estas biomoléculas “ancestrales” son capaces de interactuar para dar lugar a agregados macromoleculares estables. En este contexto, se ha propuesto recientemente un interesante mecanismo para la formación de péptidos *in situ* a partir de putativos sustratos prebióticos, tales como ácidos grasos y derivados de los aminoácidos valina y arginina. Cabe destacar que aquellas vesículas de ácidos grasos preformadas en presencia de aductos ácido oleico-Arginina permitieron a oligonucleótidos ARN incrementar su concentración local (Izgu y cols., 2016).

Las PA son necesarias para la mayoría de las funciones básicas de la vida, entre las que se incluyen la fidelidad en la replicación, transcripción, traducción y respuestas al estrés (Pegg, 2009; Mandal y cols., 2015). Esto sugiere que las PA son moléculas muy primitivas en la evolución de los procesos moleculares, y de hecho han sido propuestas como Moléculas Universales Esenciales (Norris y cols., 2014) estrechamente ligadas a la supervivencia celular y la proliferación (Igarashi y Kashiwagi, 2010). Otros trabajos proporcionan importantes pistas acerca del papel de las PA antes incluso de la vida en sí misma. Algunos autores han identificado precursores de las PA en meteoritos, como en el meteorito de Murchinson. Más específicamente, los compuestos ácido DL-2,3- diaminopropanoico, ácido DL-2,4- diaminobutanoico, ácido 4,4'-diaminoisopentanoico, ácido 3,3'-diaminoisobutanoico y ácido 2,3- diaminobutanoico fueron identificados en extractos de los cóndrilos de los meteoritos (Meierhenrich y cols., 2004; Burton y cols., 2012). Las PA también han sido propuestas como catalizadores muy potentes en procesos de transaminación que pueden darse en otros procesos moleculares que dan lugar a transferencias de quiralidad en biomoléculas estándar en meteoritos (Breslow y cols., 2006).

Por último, la tecnología de transporte de fármacos mediante nanoliposomas está ganando importancia en el uso en terapias que utilizan inclusiones de ácidos nucleicos en vesículas y transporte dirigido (Wheeler y cols., 1999) como por ejemplo oligonucleótidos para terapia inmune (Mui y cols., 2001), así como ribozimas y ARNs para silenciamiento

génico (Jeffs y cols., 2005; Zimmermann y cols., 2006). Sin embargo, esta tecnología presenta algunas limitaciones físico-químicas. El proceso de encapsulación requiere normalmente el uso de lípidos catiónicos, o incluso la utilización de lípidos ligados a polietilenglicol con el fin de estabilizar las vesículas y dirigirlos correctamente a las células diana (Sercombe y cols., 2015). Además, la encapsulación debe llevarse a cabo durante la formación de las vesículas, o utilizando elementos desestabilizadores para poder encapsular la molécula en el interior de los liposomas (Wang y Huang, 2003). El conocimiento derivado del presente trabajo podría ayudar a solucionar algunos de los actuales problemas, como la inclusión, formación y/o estabilización de las moléculas insertadas en liposomas mediante el uso de PA, lo cual aumentaría la eficiencia y las posibilidades de éxito de las estrategias terapéuticas basadas en el transporte de fármacos mediante nanoliposomas.

Consideraciones finales



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En las últimas 3 décadas se ha producido un avance importante en el conocimiento de las funciones fisiológicas de las PA derivadas de la ornitina en mamíferos (Put, Spd y Spm). Cabe resaltar el carácter esencial de estas aminas biogénicas en el crecimiento, la regulación del ciclo celular, y la velocidad y fidelidad de la transcripción y la traducción (Cohen, 1998), lo que le confiere un papel muy relevante en la carcinogénesis y proliferación de células cancerosas. También tienen un papel destacado en la progresión de los tumores puesto que favorecen los mecanismos de migración y metástasis (Odelund y cols., 2009). Además, están implicadas en otras patologías humanas como epilepsia, Alzheimer y psoriasis, entre otras enfermedades (Lightfoot y Hall, 2014). Todos estos datos (muchos de ellos fenomenológicos) sobre la implicación de las PA en la fisiopatología de mamíferos remarcan no solo el interés sino la necesidad de estudiar las interacciones moleculares de las PA con otros elementos biomoleculares en entornos celulares con significados fisiológicos y patológicos.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado la bioquímica y biología molecular de las aminas biogénicas durante más de 25 años, generando más de 100 publicaciones. Esa experiencia, a su vez, ha dado lugar a diversas preguntas aún pendientes sobre la relación específica de las PA con biomoléculas o procesos relacionados con las membranas biológicas. Trabajos previos del grupo (García-Faroldi y cols., 2010) indicaban claramente un papel de las PA en la diferenciación y producción de vesículas de células productoras y almacenadoras de Hia y/u otras aminas biogénicas. Para profundizar en este tema en escenarios fisiológicos donde confluyan PA y otras aminas biogénicas como la Hia y la 5-HT, es necesario contar con métodos fiables de evaluación de la expresión de los genes implicados en el metabolismo y señalización de estas aminas.

El Anexo I de esta tesis se dedicó a la optimización de métodos de evaluación de la expresión de receptor de membrana citoplasmática H₃R (ARNm), y los niveles de ARNm y actividad enzimática de la HDC (enzima localizada en el lumen del retículo endoplásmico), en distintos tipos de células humanas donde pueden confluir los metabolismos (incluyendo recepción y producción) de PA e Hia. Este desarrollo metodológico facilitará futuras investigaciones del grupo u otros grupos interesados en el metabolismo de aminas biogénicas. Por ejemplo, los métodos de evaluación de expresión y actividad de HDC fueron útiles para abordar el estudio que se muestra en el Capítulo I de esta tesis.

Como se ha mencionado, hace unos años observamos que la inhibición de la síntesis de PA al utilizar DFMO alteraba el patrón de diferenciación de mastocitos y la síntesis y secreción de Hia (García-Faroldi y cols., 2009a). Casi simultáneamente, el parálogo de ODC humana, e inhibidor de AZ, denominado AZIN2, fue asociado a las vesículas de mastocitos por un grupo independiente (Kanerva y cols., 2009); por tanto AZIN2 podría tener en ese contexto fisiológico un efecto similar al del inhibidor químico DFMO. Esta hipótesis ha sido validada en esta tesis (Anexo II). El modelo celular utilizado fueron BMMCs aislados de ratones hipomórficos para *Azin2* y sus controles respectivos (descritos y proporcionados por López-García y cols., 2013). Esta nueva aproximación evita los posibles efectos secundarios que un compuesto exógeno pueda producir en el sistema y tiene mayor valor fisiológico. El conjunto de los resultados obtenidos sugiere que AZIN2 juega algún papel en el control y coordinación de la biosíntesis y el contenido de Hia y 5-HT en mastocitos, lo cual supone la principal novedad del Capítulo I. Los resultados muestran que, a pesar del hecho de que la expresión de *Azin2* parezca ser minoritaria en mastocitos de ratón respecto a otros genes parálogos (*Odc* y *Azin1*), se pueden observar alteraciones importantes en la biosíntesis, contenido y secreción de las aminas. En este punto, es importante mencionar que tanto las PA como Hia y 5-HT comparten varios escenarios fisiológicos, incluyendo el sistema nervioso central y periférico, el tracto gastrointestinal, el eje entérico cerebro-estomago, y los sistemas inmune y reproductivos (Sánchez-Jimenez y cols., 2007). Por tanto, se puede sugerir que diferencias en el ratio *Azin2/Azin1* o *Azin2/Odc* en algunos tejidos u organismos, podrían explicar diferencias fenotípicas relacionadas con la fisiopatología de las aminas. Estos datos pueden ser interesantes, por tanto, en el ámbito de la medicina personalizada.

No se nos escapa el hecho de que las observaciones presentadas se han obtenido en un modelo de mastocitos de ratón. Por tanto, se consideró interesante estudiar si las interacciones entre PA y aminos biógenas eran reproducibles en un modelo humano. Estas consideraciones llevaron a plantear la posibilidad de una colaboración con la Universidad de Kent, en el laboratorio del Dr. Bernhard F. Gibbs. Dado que no es posible seguir la misma estrategia que en el modelo de ratón, se abordó la posibilidad de sobreexpresar SSAT. Como ya se ha mencionado, esto conllevaría una disminución importante de los niveles de PA, siendo similar, por tanto, al fenotipo observado en el Capítulo I de la presente memoria. Para llevar a cabo la sobreexpresión de SSAT, se seleccionaron en base a la bibliografía dos compuestos, resveratrol y DENSpm, esto es, un compuesto natural y un análogo de Spm sintetizado *in vitro*. Como modelo de estudio, se utilizaron la línea celular de mastocitos humanos LAD2, así como basófilos purificados de sangre de individuos sanos. Los resultados presentados en esta memoria dan una idea de cómo ambos compuestos son capaces de producir una inhibición en el proceso de desgranulación elicitada por el complejo IgE/anti-IgE. Ya se ha discutido en el Capítulo II sobre los posibles efectos secundarios del resveratrol, tanto en Syk como en algunas proteínas implicadas en la cascada de señalización celular de IgE. Los resultados presentados son preeliminaes y, por tanto, es discutible que los efectos del resveratrol puedan ser directamente dependientes y/o relacionados con los niveles de SSAT o de PA. Para esclarecer esta cuestión, serán necesarios futuros experimentos usando éste u otros modelos de mastocitos humanos. Por otra parte, la inhibición provocada por DENSpm parece ser más específica para SSAT, si bien es de menor magnitud que la obtenida con resveratrol. No obstante, las variaciones observadas en HIF1 α y TPH-1 se han de estudiar con mayor profundidad, puesto que podrían estar relacionadas con los niveles de PA. Igualmente, serán necesarios nuevos experimentos para determinar el mecanismo por el cual DENSpm produce la inhibición en la liberación de Hia. A pesar de su carácter preliminar, estos resultados abren nuevas vías de estudio interesantes sobre los posibles efectos de DENSpm en la liberación de Hia en mastocitos y basófilos humanos. Además, parece reforzar la idea observada en el Capítulo I de que las PA son un elemento importante en las interacciones con elementos de membrana, dado que alteraciones en los niveles de PA producen variaciones en la liberación elicitada por IgE, que como ya se ha mencionado, es un proceso dependiente de exocitosis.

Durante toda la memoria hemos tratado con diversos elementos del metabolismo de aminos y sus relaciones con procesos metabólicos que implican la dinámica de las membranas biológicas. Así, surgió el interés de estudiar, en un sistema simplificado abordable mediante técnicas biofísicas, las posibilidades de interacción directa de las PA con las membranas biológicas. Los antecedentes bibliográficos ya aportaban algunas características de las interacciones directas entre PA y membranas (Finger y cols., 2014), así como entre PA y ácidos nucleicos (Ruiz-Chica y cols., 2001, 2003) de forma independiente. Sin embargo, los resultados expuestos en el Capítulo III de la presente Tesis Doctoral (y Anexo III) proporcionan por vez primera evidencias experimentales de interacciones simultáneas entre las PA con bicapas lipídicas cargadas negativamente y polirribonucleótidos, siendo esta la principal aportación de este capítulo. Esto se ha demostrado usando tanto determinaciones biofísicas indirectas como visualización directa de los efectos dinámicos mediante microscopía confocal. El grado de estas interacciones parece ser dependiente de las características estéricas y electrostáticas de las biomoléculas que interactúan, así como el grado de curvatura de las vesículas. Asimismo, nuestros resultados fueron obtenidos utilizando vesículas que imitaban a las de un ambiente prebiótico, además de ARNt y PA, esto es, biomoléculas primitivas que aún son esenciales en los seres vivos actualmente. Los resultados refuerzan la hipótesis de que las PA pudieron tener un papel crucial en la formación de protocélulas bastante similares a LUCA. Esta nueva información de interacciones estables en un tripartito liposoma-PA-ARNt podría ayudar a entender aspectos moleculares claves en las múltiples funciones celulares asociadas a las PA en diferentes escenarios que impliquen la presencia de biomembranas, como por ejemplo endocitosis, exocitosis, la modulación de vías de señalización mediadas por PIP, y la síntesis de proteínas. Todos estos procesos son fundamentales en organismos vivos.

Adicionalmente, este conocimiento podría alumbrar el desarrollo de nuevas estrategias en el progreso de la biotecnología del transporte de fármacos mediante nanoliposomas, esto es, mediante el desarrollo de estrategias más eficientes para terapias basadas en ARN interferente.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusiones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los resultados recogidos en la presente Tesis Doctoral permiten enunciar las siguientes conclusiones:

En relación al objetivo 1.1.

Se ha demostrado, por vez primera, que AZIN2, un elemento hasta la fecha descrito exclusivamente como un regulador del metabolismo de las poliaminas, está también involucrado en la regulación de la biosíntesis y contenido de otras aminas biógenas, como son histamina y serotonina, en mastocitos de ratón.

En relación al objetivo 1.2.

Se ha demostrado que los compuestos resveratrol y DENSpm son capaces de inhibir la liberación de histamina inducida por IgE/anti-IgE, tanto en basófilos humanos purificados como en la línea celular de mastocitos LAD2.

Aunque también estos compuestos disminuyen la expresión de proteínas como HIF1 α y TPH1, no ha sido posible demostrar la sobreexpresión inducida de SSAT ni la consecuente disminución de los niveles de poliaminas. Así pues, se desconoce el mecanismo causante de la inhibición observada en la liberación de histamina.

En relación al objetivo 2.

Se ha demostrado experimentalmente, por primera vez, que las poliaminas son capaces de interaccionar al mismo tiempo con membranas lipídicas y con ácidos nucleicos, indicando un fenómeno de equilibrio múltiple. Estas observaciones se han realizado tanto con liposomas compuestos por fosfolípidos, como con vesículas formadas por cadenas alifáticas con cierto grado de oxidación.

Los datos aquí presentados podrían evocar posibles procesos primitivos de la evolución prebiótica. En el otro extremo de la escala temporal, este sistema podría constituir una interesante herramienta en el desarrollo de distribución de fármacos a escala nanoscópica.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusions



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

The results included in the present Doctoral Thesis allow stating the following conclusions:

Conclusions related to aim 1.1.

It has been demonstrated, for the first time, that AZIN2, an element so far described as exclusively devoted to the regulation of polyamine metabolism, is also involved in the regulation of the biosynthesis and content of other biogenic amines, such as serotonin and histamine, in mouse mast cells.

Conclusions related to aim 1.2.

It has been demonstrated that resveratrol and DENSp_m are able to inhibit histamine release induced by IgE/anti-IgE, both in human purified basophils and LAD2 mast cell line.

Although these compounds seem to reduce HIF1 α and TPH1 protein levels, it has not been possible to demonstrate either SSAT overexpression or decrease in polyamine levels. Thus, the mechanism behind the observed inhibition of histamine release remains unknown.

Conclusions related to aim 2.

It has been demonstrated experimentally, for the first time, that polyamines are able to interact simultaneously both with lipid membranes and nucleic acids, suggesting a multiple equilibrium process. These observations have been tested with phospholipid liposomes as well as with vesicles composed of aliphatic chains with some degree of oxidation.

Data here presented could evoke putative primitive processes of proto-biotic evolution. At the other end of the time scale, the system may constitute an interesting tool in the development of nanoscale drug delivery.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Referencias



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Ackermann, H.W., & Prangishvili, D. (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology*, 157(10), 1843-1849. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1383-y>
- Acosta-Andrade, C., Lambertos, A., Urdiales, J. L., Sánchez-Jiménez, F., Peñafiel, R., & Fajardo, I. (2016). A novel role for antizyme inhibitor 2 as a regulator of serotonin and histamine biosynthesis and content in mouse mast cells. *Amino Acids*, 48(10), 2411-2421. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2230-3>
- Adair, G. M., & Siciliano, M. J. (1985). Linkage of the MBG locus to another functionally hemizygous gene locus (IDH2) on chromosome Z3 in Chinese hamster ovary cells. *Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 109-113.
- Agostinelli, E., Vianello, F., Magliulo, G., Thomas, T., & Thomas, T. J. (2015). Nanoparticle strategies for cancer therapeutics: Nucleic acids, polyamines, bovine serum amine oxidase and iron oxide nanoparticles (Review). *International Journal of Oncology*, 46(1), 5-16. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2706>
- Ahern, G. P. (2011). 5-HT and the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(1), 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.02.004>
- Ai, W., Liu, Y., Langlois, M., & Wang, T. C. (2004). Kruppel-like factor 4 (KLF4) represses histidine decarboxylase gene expression through an upstream Sp1 site and downstream gastrin responsive elements. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 8684-8693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308278200>
- Amburgey, J. C., Shuey, S. W., Pedersen, L. G., Hiskey, R. G. (1994). Small molecule analogs of [[phospholipid-metal ion binding sites: synthesis and molecular modelling of cyclohexane-1,2,4-triol triphosphates. *Bioorganic Chemistry*, 22, 172-197.
- Angelova, M. I., & Tsoneva, I. (1999). Interactions of DNA with giant liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 101(1), 123-137.
- Arock, M. (2016). Mast cell differentiation: still open questions? *Blood*, 127(4), 373-374. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-686592>
- Arrang, J. M., Garbarg, M., & Schwartz, J. C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*, 302(5911), 832-837.
- Babe K.S.S. (1996). Histamina, bradicinina y sus antagonistas. *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Hardman J.G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W. & Goodman Gilman, A., Ed. MacGraw-Hill Interamericana, México, D. F. 621-641.
- Bachrach, U. (2005). Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Current Protein & Peptide Science*, 6(6), 559-566.
- Badawy, A. A.-B. (2015). Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. *Bioscience Reports*, 35(5). <https://doi.org/10.1042/BSR20150197>
- Baek, J. H., Liu, Y. V., McDonald, K. R., Wesley, J. B., Zhang, H., & Semenza, G. L. (2007). Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33358-33366. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705627200>
- Bagatolli, L. A. (2003). Thermotropic behavior of lipid mixtures studied at the level of single vesicles: giant unilamellar vesicles and two-photon excitation fluorescence microscopy. *Methods in Enzymology*, 367, 233-253. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)67015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67015-1)
- Bakker, R. A. (2004). Histamine H3-receptor isoforms. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 53(10), 509-516. <https://doi.org/10.1007/s00011-004-1286-9>
- Bangham, A. D., & Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8, 660-668.
- Bardocz, S., & White, A. (1998). Effect of lectins on uptake of polyamines. *Methods in Molecular Medicine*, 9, 393-405. <https://doi.org/10.1385/0-89603-396-1:393>
- Barnes, N. M., & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), 1083-1152.
- Bartholeyns, J. (1983). Subcellular distribution of ornithine decarboxylase in rat liver and accessibility of the enzyme to alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *Life Sciences*, 32(12), 1305-1312.
- Bartholeyns, J., & Bouclier, M. (1984). Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Research*, 44(2), 639-645.
- Belting, M., Borsig, L., Fuster, M. M., Brown, J. R., Persson, L., Fransson, L.-A., & Esko, J. D. (2002). Tumor attenuation by combined heparan sulfate and polyamine depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 371-376. <https://doi.org/10.1073/pnas.012346499>

- Belting, M., Havsmark, B., Jönsson, M., Persson, S., & Fransson, L. A. (1996). Heparan sulphate/heparin glycosaminoglycans with strong affinity for the growth-promoter spermine have high antiproliferative activity. *Glycobiology*, 6(2), 121-129.
- Belting, M., Mani, K., Jönsson, M., Cheng, F., Sandgren, S., Jonsson, S., Ding, K., Delcros J. G., & Fransson, L.-A. (2003). Glypican-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells: a pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 47181-47189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308325200>
- Benhamou, M., Gutkind, J. S., Robbins, K. C., & Siraganian, R. P. (1990). Tyrosine phosphorylation coupled to IgE receptor-mediated signal transduction and histamine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14), 5327-5330.
- Böttcher, C.J.F., van Gent, C. M., & Fries, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Analytica Chimica Acta*, 24, 203-204.
- Brachet, P., Debbabi, H., & Tomé, D. (1995). Transport and steady-state accumulation of putrescine in brush-border membrane vesicles of rabbit small intestine. *The American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 1), G754-G762.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braga, T., Ringvall, M., Tveit, H., Abrink, M., & Pejler, G. (2009). Reduction with dithiothreitol causes serglycin-specific defects in secretory granule integrity of bone marrow derived mast cells. *Molecular Immunology*, 46(3), 422-428. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.019>
- Broide, D. H. (2001). Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(2 Suppl), S65-71.
- Bruhns, P., & Jönsson, F. (2015). Mouse and human FcR effector functions. *Immunological Reviews*, 268(1), 25-51. <https://doi.org/10.1111/imr.12350>
- Brunton L.L. (1996). Fármacos para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de úlceras pépticas. *Goodman & Gilman. Las bases moleculares de la terapéutica. Hardman J.G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W. & Goodman Gilman, A. Ed. MacGraw-Hill Interamericana, México, D. F.* 965-980.
- Budin, I., Prwyres, N., Zhang, N., & Szostak, J. W. (2014). Chain-length heterogeneity allows for the assembly of fatty acid vesicles in dilute solutions. *Biophysical Journal*, 107(7), 1582-1590. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.067>
- Burton, A. S., Stern, J. C., Elsila, J. E., Glavin, D. P., & Dworkin, J. P. (2012). Understanding prebiotic chemistry through the analysis of extraterrestrial amino acids and nucleobases in meteorites. *Chemical Society Reviews*, 41(16), 5459-5472. <https://doi.org/10.1039/c2cs35109a>
- Byers, T. L., & Pegg, A. E. (1989). Properties and physiological function of the polyamine transport system. *The American Journal of Physiology*, 257(3 Pt 1), C545-553.
- Byers, T. L., Wechter, R., Nuttall, M. E., & Pegg, A. E. (1989). Expression of a human gene for polyamine transport in Chinese-hamster ovary cells. *The Biochemical Journal*, 263(3), 745-752.
- Byrne, R. D., Garnier-Lhomme, M., Han, K., Dowicki, M., Michael, N., Totty, N., Zhendre, V., Cho, A., Pettitt, T. R., Wakelam, M. J., Poccia, D. L., & Larijani, B. (2007). PLCgamma is enriched on poly-phosphoinositide-rich vesicles to control nuclear envelope assembly. *Cellular Signalling*, 19(5), 913-922. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.10.011>
- Casero, R. A., & Marton, L. J. (2007). Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(5), 373-390. <https://doi.org/10.1038/nrd2243>
- Casero, R. A., & Pegg, A. E. (1993). Spermidine/spermine N1-acetyltransferase—the turning point in polyamine metabolism. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(8), 653-661.
- Cason, A. L., Ikeguchi, Y., Skinner, C., Wood, T. C., Holden, K. R., Lubs, H. A., Martinez, F., Simensen, R. J., Stevenson, R. E., Pegg, A.E., & Schwartz, C. E. (2003). X-linked spermine synthase gene (SMS) defect: the first polyamine deficiency syndrome. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 11(12), 937-944. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201072>
- Cassard, L., Jönsson, F., Arnaud, S., & Daëron, M. (2012). Fcγ receptors inhibit mouse and human basophil activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(6), 2995-3006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200968>
- Chaves, P., Correa-Fiz, F., Melgarejo, E., Urdiales, J. L., Medina, M. A., & Sánchez-Jiménez, F. (2007). Development of an expression macroarray for amine metabolism-related genes. *Amino Acids*, 33(2), 315-322. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0528-x>
- Chen, Y., Weeks, R. S., Burns, M. R., Boorman, D. W., Klein-Szanto, A., & O'Brien, T. G. (2006). Combination therapy with 2-difluoromethylornithine and a polyamine transport inhibitor against murine squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 118(9), 2344-2349. <https://doi.org/10.1002/ijc.21621>

- Chiang, B.-Y., Chou, C.-C., Hsieh, F.-T., Gao, S., Lin, J. C.-Y., Lin, S.-H., Chen, T.-C., Khoo, K.-H., & Lin, C.-H. (2012). In vivo tagging and characterization of S-glutathionylated proteins by a chemoenzymatic method. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 51(24), 5871-5875. <https://doi.org/10.1002/anie.201200321>
- Childs, A. C., Mehta, D. J., & Gerner, E. W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 60(7), 1394-1406. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2332-4>
- Cho, C., Nguyen, A., Bryant, K. J., O'Neill, S. G., & McNeil, H. P. (2016). Prostaglandin D2 metabolites as a biomarker of in vivo mast cell activation in systemic mastocytosis and rheumatoid arthritis. *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(1), 64-69. <https://doi.org/10.1002/iid3.94>
- Choi, W., Proctor, L., Xia, Q., Feng, Y., Gerner, E. W., Chiao, P. J., Hamilton, S. R., & Zhang, W. (2006). Inactivation of IkappaB contributes to transcriptional activation of spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase. *Molecular Carcinogenesis*, 45(9), 685-693. <https://doi.org/10.1002/mc.20239>
- Coburn, R. F. (2009). Polyamine effects on cell function: Possible central role of plasma membrane PI(4,5)P2. *Journal of Cellular Physiology*, 221(3), 544-551. <https://doi.org/10.1002/jcp.21899>
- Coffino, P. (2001). Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(3), 188-194. <https://doi.org/10.1038/35056508>
- Cohen, S. S. (1998) A guide to the polyamines. *Oxford University Press, New York*
- Conti, P., Castellani, M. L., Kempuraj, D., Salini, V., Vecchiet, J., Tetè, S., Mastrangelo, F., Perrella, A., De Lutiis, M. A., Tagen, M., & Theoharides, T. C. (2007). Role of mast cells in tumor growth. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 37(4), 315-322.
- Coussens, L. M., Raymond, W. W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., ... Hanahan, D. (1999). Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes & Development*, 13(11), 1382-1397.
- Crivellato, E., Nico, B., & Ribatti, D. (2011). The history of the controversial relationship between mast cells and basophils. *Immunology Letters*, 141(1), 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.06.008>
- Csaba, G. (2015). Mast cell, the peculiar member of the immune system: A homeostatic aspect. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, 62(3), 207-231. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.3.1>
- Cunningham-Rundles, S., & Maas, W. K. (1975). Isolation, characterization, and mapping of Escherichia coli mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxylase. *Journal of Bacteriology*, 124(2), 791-799.
- da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 62(10), 698-738. <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
- Dale, H. H., & Laidlaw, P. P. (1910). The physiological action of beta-aminazolyethylamine. *The Journal of Physiology*, 41(5), 318-344.
- Dantuma, N. P., Acs, K., & Luijsterburg, M. S. (2014). Should I stay or should I go: VCP/p97-mediated chromatin extraction in the DNA damage response. *Experimental Cell Research*, 329(1), 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.025>
- Davson, H., & Danielli, J. F. (1936). Studies on the permeability of erythrocytes: The alleged reversal of ionic permeability at alkaline reaction. *The Biochemical Journal*, 30(2), 316-320.
- del Valle, A. E., Paz, J. C., Sánchez-Jiménez, F., & Medina, M. A. (2001). Agmatine uptake by cultured hamster kidney cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(1), 307-311. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4101>
- Dela Vega, A. L., & Delcour, A. H. (1996). Polyamines decrease Escherichia coli outer membrane permeability. *Journal of Bacteriology*, 178(13), 3715-3721.
- Demurtas, D., Guichard, P., Martiel, I., Mezzenga, R., Hébert, C., & Sagalowicz, L. (2015). Direct visualization of dispersed lipid bicontinuous cubic phases by cryo-electron tomography. *Nature Communications*, 6, 8915. <https://doi.org/10.1038/ncomms9915>
- Dot, J., Lluch, M., Blanco, I., & Rodríguez-Alvarez, J. (2000). Polyamine uptake in cultured astrocytes: characterization and modulation by protein kinases. *Journal of Neurochemistry*, 75(5), 1917-1926.
- Dunzendorfer, U., & Russell, D. H. (1978). Altered polyamine profiles in prostatic hyperplasia and in kidney tumors. *Cancer Research*, 38(8), 2321-2324.
- Dy, M., Pacilio, M., Arnould, A., Machavoine, F., Mayeux, P., Hermine, O., Bodger, M., & Schneider, E. (1999). Modulation of histidine decarboxylase activity and cytokine synthesis in human leukemic cell lines: relationship with basophilic and/or megakaryocytic differentiation. *Experimental Hematology*, 27(8), 1295-1305.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstein, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Breitenbach, M., Grubeck-Loebenstern, B., Herker, E., Fahrenkrog, B., Fröhlich, K. U., Sinner, F., Tavernarakis, N., Minois, N., Kroemer, G.,

- & Madeo, F. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1305-1314. <https://doi.org/10.1038/ncb1975>
- El-Merahbi, R., Löffler, M., Mayer, A., & Sumara, G. (2015). The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Letters*, 589(15), 1728-1734. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.054>
- Enerbäck, L. (1965). Mast cells in carcinoid tumours. Distribution, histochemical properties and 5-hydroxytryptamine content. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, 64(4), 491-505.
- Engel, N., Olmo, M.T., Coleman, C.S., Medina, M.A., Pegg, A.E., & Sánchez-Jiménez F. (1996). Experimental evidence for structure-activity features in common between mammalian histidine decarboxylase and ornithine decarboxylase. *Biochemical Journal*, 320(1), 365-368.
- Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068), 578-580. <https://doi.org/10.1038/nature04394>
- Erspamer, V., & Asero, B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 169(4306), 800-801.
- Fadeel, B., & Xue, D. (2009). The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(5), 264-277. <https://doi.org/10.1080/10409230903193307>
- Fajardo, I., Urdiales, J. L., Medina, M. A., & Sanchez-Jimenez, F. (2001). Effects of phorbol ester and dexamethasone treatment on histidine decarboxylase and ornithine decarboxylase in basophilic cells. *Biochemical Pharmacology*, 61(9), 1101-1106.
- Fajardo, I., Urdiales, J. L., Paz, J. C., Chavarria, T., Sánchez-Jiménez, F., & Medina, M. A. (2001). Histamine prevents polyamine accumulation in mouse C57.1 mast cell cultures. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(3), 768-773.
- Fal, W., Brańska, B., Lucińska, A., & Galary, E. (1985). Basophil histamine and peripheral blood serotonin in metal and toxic gas poisoning. *Medycyna Pracy*, 36(6), 377-381.
- Falcone, F. H., Zillikens, D., & Gibbs, B. F. (2006). The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Experimental Dermatology*, 15(11), 855-864. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00477.x>
- Falus, A., Hegyesi, H., Lázár-Molnár, E., Pós, Z., László, V., & Darvas, Z. (2001). Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends in Immunology*, 22(12), 648-652.
- Fan, Y., Hu, W., Dai, H., Zhang, J., Zhang, L., He, P., Shen, Y., Ohtsu, H., Wei, E.Q., & Chen, Z. (2011). Activation of the central histaminergic system is involved in hypoxia-induced stroke tolerance in adult mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(1), 305-314. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.94>
- Fidalgo, S., Ivanov, D. K., & Wood, S. H. (2013). Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology*, 14(1), 21-45. <https://doi.org/10.1007/s10522-012-9406-3>
- Finger, S., Schwieger, C., Arouri, A., Kerth, A., & Blume, A. (2014). Interaction of linear polyamines with negatively charged phospholipids: the effect of polyamine charge distance. *Biological Chemistry*, 395(7-8), 769-778. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0126>
- Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1929). PHOSPHORUS COMPOUNDS OF MUSCLE AND LIVER. *Science (New York, N.Y.)*, 70(1816), 381-382. <https://doi.org/10.1126/science.70.1816.381-a>
- Fogel-Petrovic, M., Kramer, D. L., Ganis, B., Casero, R. A., & Porter, C. W. (1993). Cloning and sequence analysis of the gene and cDNA encoding mouse spermidine/spermine N1-acetyltransferase—a gene uniquely regulated by polyamines and their analogs. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1216(2), 255-264.
- Folkman, J. (1990). Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Reviews*, 9(3), 171-174.
- Folkman, J. (1995). The influence of angiogenesis research on management of patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 36(2), 109-118.
- Franceschin, M., Lombardo, C. M., Pascucci, E., D'Ambrosio, D., Micheli, E., Bianco, A., Ortaggi, G., & Savino, M. (2008). The number and distances of positive charges of polyamine side chains in a series of perylene diimides significantly influence their ability to induce G-quadruplex structures and inhibit human telomerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(5), 2292-2304. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.11.065>
- Fu, H.-J., Zhao, Y., Zhou, Y.-R., Bao, B.-H., Du, Y., & Li, J.-X. (2015). Ursolic acid derivatives as bone anabolic agents targeted to tryptophan hydroxylase 1 (Tph-1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 76, 33-47. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.04.021>
- Fujita, K., Murakami, Y., & Hayashi, S. (1982). A macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase. *The Biochemical Journal*, 204(3), 647-652.

- Furuta, K., Adachi, K., Komazawa, Y., Mihara, T., Miki, M., Azumi, T., Fujisawa, T., Katsube, T., & Kinoshita, Y. (2006). Tolerance to H₂ receptor antagonist correlates well with the decline in efficacy against gastroesophageal reflux in patients with gastroesophageal reflux disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(10), 1581-1585. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04323.x>
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2008). Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *Journal of Dermatological Science*, 49(1), 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.09.009>
- García-Faroldi, G., Correa-Fiz, F., Abbrighach, H., Berdasco, M., Fraga, M. F., Esteller, M., Urdiales, J. L., Sánchez-Jiménez, F., & Fajardo, I. (2009b). Polyamines affect histamine synthesis during early stages of IL-3-induced bone marrow cell differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(1), 261-271. <https://doi.org/10.1002/jcb.22246>
- García-Faroldi, G., Rodríguez, C. E., Urdiales, J. L., Pérez-Pomares, J. M., Dávila, J. C., Pejler, G., Sánchez-Jiménez, F., & Fajardo, I. (2010). Polyamines are present in mast cell secretory granules and are important for granule homeostasis. *PloS One*, 5(11), e15071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015071>
- García-Faroldi, G., Sánchez-Jiménez, F., & Fajardo, I. (2009a). The polyamine and histamine metabolic interplay in cancer and chronic inflammation. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12(1), 59-65. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328314b9ac>
- Gerhard, M., Neumayer, N., Presecan-Siedel, E., Zanner, R., Lengyel, E., Cramer, T., Höcker, M., & Prinz, C. (2001). Gastrin induces expression and promoter activity of the vesicular monoamine transporter subtype 2. *Endocrinology*, 142(8), 3663-3672. <https://doi.org/10.1210/endo.142.8.8311>
- Gerner, E. W., & Meyskens, F. L. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews. Cancer*, 4(10), 781-792. <https://doi.org/10.1038/nrc1454>
- Gifford, R. R., Ferguson, R. M., & Voss, B. V. (1981). Cimetidine reduction of tumour formation in mice. *Lancet (London, England)*, 1(8221), 638-640.
- Gilmour, S. K. (2007). Polyamines and nonmelanoma skin cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.023>
- Goñi, F. M., Villar, A. V., Nieva, J. L., & Alonso, A. (2003). Interaction of phospholipases C and sphingomyelinase with liposomes. *Methods in Enzymology*, 372, 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)72001-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)72001-1)
- Goñi, F. M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1838(6), 1467-1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.006>
- Gordon, J. R., & Galli, S. J. (1991). Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 174(1), 103-107.
- Gorter, E., & Grendel, F. (1925). On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *The Journal of Experimental Medicine*, 41(4), 439-443.
- Goto, Y., Kurashima, Y., & Kiyono, H. (2015). The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Rheumatology*, 27(4), 388-396. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000192>
- Goyal, R., Bansal, R., Gandhi, R. P., & Gupta, K. C. (2014). Copolymers of covalently crosslinked linear and branched polyethylenimines as efficient nucleic acid carriers. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(11), 3269-3279.
- Graber, T. Z., Gericke, A., & Kooijman, E. E. (2014). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ionization in the presence of cholesterol, calcium or magnesium ions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 182, 62-72.
- Grancara, S., Zonta, F., Ohkubo, S., Brunati, A. M., Agostinelli, E., & Toninello, A. (2015). Pathophysiological implications of mitochondrial oxidative stress mediated by mitochondriotropic agents and polyamines: the role of tyrosine phosphorylation. *Amino Acids*, 47(5), 869-883. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1964-7>
- Green, M. L., Chung, T. E., Reed, K. L., Modric, T., Badinga, L., Yang, J., Simmen, F. A., & Simmen, R. C. (1998). Paracrine inducers of uterine endometrial spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene expression during early pregnancy in the pig. *Biology of Reproduction*, 59(5), 1251-1258.
- Grossi, M., Phanstiel, O., Rippe, C., Swärd, K., Alajbegovic, A., Albinsson, S., Forte, A., Persson, L., Hellstrand, P., & Nilsson, B.-O. (2016). Inhibition of Polyamine Uptake Potentiates the Anti-proliferative Effect of Polyamine Synthesis Inhibition and Preserves the Contractile Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 231(6), 1334-1342. <https://doi.org/10.1002/jcp.25236>

- Gurish, M. F., & Austen, K. F. (2012). Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*, 37(1), 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.003>
- Gutzmer, R., Gschwandtner, M., Rossbach, K., Mommert, S., Werfel, T., Kietzmann, M., & Baeumer, W. (2011). Pathogenetic and therapeutic implications of the histamine H4 receptor in inflammatory skin diseases and pruritus. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 3, 985-994.
- Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., & Casero, R. A. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(19), 11140-11145.
- Han, S.-Y., Bae, J.-Y., Park, S.-H., Kim, Y.-H., Park, J. H. Y., & Kang, Y.-H. (2013). Resveratrol inhibits IgE-mediated basophilic mast cell degranulation and passive cutaneous anaphylaxis in mice. *The Journal of Nutrition*, 143(5), 632-639. <https://doi.org/10.3945/jn.112.173302>
- Hatta, E., Yasuda, K., & Levi, R. (1997). Activation of histamine H3 receptors inhibits carrier-mediated norepinephrine release in a human model of protracted myocardial ischemia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(2), 494-500.
- Hayashi, S., Murakami, Y., & Matsufuji, S. (1996). Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(1), 27-30.
- Hay-Schmidt, A. (2000). The evolution of the serotonergic nervous system. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 267(1448), 1071-1079. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1111>
- Heby, O., & Persson, L. (1990). Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(4), 153-158.
- Hill, S. J., Ganellin, C. R., Timmerman, H., Schwartz, J. C., Shankley, N. P., Young, J. M., Schunack, W., Levi, R., & Haas, H. L. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 49(3), 253-278.
- Hirota, N., McCuaig, S., O'Sullivan, M. J., & Martin, J. G. (2014). Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research*, 12(3), 599-609. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.02.003>
- Höcker, M., Zhang, Z., Koh, T. J., & Wang, T. C. (1996). The regulation of histidine decarboxylase gene expression. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 69(1), 21-33.
- Hori, H., Terui, Y., Nakamoto, C., Iwashita, C., Ochi, A., Watanabe, K., & Oshima, T. (2016). Effects of polyamines from *Thermus thermophilus*, an extreme-thermophilic eubacterium, on tRNA methylation by tRNA (Gm18) methyltransferase (TrmH). *Journal of Biochemistry*, 159(5), 509-517. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv130>
- Huang, Q.-D., Chen, H., Zhou, L.-H., Huang, J., Wu, J., & Yu, X.-Q. (2008). A novel macrocyclic polyamine cationic lipid containing an imidazolium salt group: synthesis, characterization and its transfection activity as a gene delivery vector. *Chemical Biology & Drug Design*, 71(3), 224-229. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00631.x>
- Huang, W., Eickhoff, J. C., Mehraein-Ghomi, F., Church, D. R., Wilding, G., & Basu, H. S. (2015). Expression of spermidine/spermine N(1)-acetyl transferase (SSAT) in human prostate tissues is related to prostate cancer progression and metastasis. *The Prostate*, 75(11), 1150-1159. <https://doi.org/10.1002/pros.22996>
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(1), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.009>
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2015). Modulation of protein synthesis by polyamines. *IUBMB Life*, 67(3), 160-169. <https://doi.org/10.1002/iub.1363>
- Ito, A., Morii, E., Maeyama, K., Jippo, T., Kim, D. K., Lee, Y. M., Ogihara, H., Hashimoto, K., Kitamura, Y., & Nojima, H. (1998). Systematic method to obtain novel genes that are regulated by mi transcription factor: impaired expression of granzyme B and tryptophan hydroxylase in mi/mi cultured mast cells. *Blood*, 91(9), 3210-3221.
- Izgu, E.C., Björkbohm, A., Kamat, N.P., Lelyveld, V.S., Zhang, W., Jia, T.Z., & Szostak, J. W. (2016). N-carboxyanhydride-mediated fatty acylation of amino acids and peptides for functionalization of protocell membranes. *Journal of American Chemistry Society*, 138, 16669-16676. doi: 10.1021/jacs.6b08801.
- Jeffs, L. B., Palmer, L. R., Ambegia, E. G., Giesbrecht, C., Ewanick, S., & MacLachlan, I. (2005). A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharmaceutical Research*, 22(3), 362-372.
- Jell, J., Merali, S., Hensen, M. L., Mazurchuk, R., Spornyak, J. A., Diegelman, P., Kisiel, N. D., Barrero, C., Deeb, K. K., Alhonen, L., Patel, M. S., & Porter, C. W. (2007). Genetically altered expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase affects fat metabolism in mice via acetyl-CoA. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8404-8413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610265200>
- Jenkins, T. A., Nguyen, J. C. D., Polglaze, K. E., & Bertrand, P. P. (2016). Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/nu8010056>

- Jeong, H. J., Na, H. J., Kim, S. J., Rim, H. K., Myung, N. Y., Moon, P. D., Han, N. R., Seo, J. U., Kang, T. H., Kim, J. J., Choi, Y., Kang, I. C., Hong, S. H., Kim, Y. A., Seo, Y. W., Kim, H. M., & Um, J. Y. (2009). Anti-inflammatory effect of Columbianetin on activated human mast cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(6), 1027-1031.
- Jha, S. K., Ross, R. J., & Morrison, A. R. (2005). Sleep-related neurons in the central nucleus of the amygdala of rats and their modulation by the dorsal raphe nucleus. *Physiology & Behavior*, 86(4), 415-426. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.033>
- Jiang, M., Liu, R., Chen, Y., Zheng, Q., Fan, S., & Liu, P. (2014). A combined experimental and computational study of Vam3, a derivative of resveratrol, and Syk interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 17188-17203. <https://doi.org/10.3390/ijms150917188>
- Jones, H., Hargrove, L., Kennedy, L., Meng, F., Graf-Eaton, A., Owens, J., Alpini, G., Johnson, C., Bernuzzi, F., Demieville, J., DeMorrow, S., Invernizzi, P., & Francis, H. (2016). Inhibition of mast cell-secreted histamine decreases biliary proliferation and fibrosis in primary sclerosing cholangitis Mdr2(-/-) mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 64(4), 1202-1216. <https://doi.org/10.1002/hep.28704>
- Joshi, A. S., Fei, N., & Greenberg, M. L. (2016). Get1p and Get2p are required for maintenance of mitochondrial morphology and normal cardiolipin levels. *FEMS Yeast Research*, 16(3). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow019>
- Kabir, A., & Kumar, G. S. (2014). Probing the interaction of spermine and 1-naphthyl acetyl spermine with DNA polynucleotides: a comparative biophysical and thermodynamic investigation. *Molecular bioSystems*, 10(5), 1172-1183. <https://doi.org/10.1039/c3mb70616h>
- Kahana, C. (2009). Antizyme and antizyme inhibitor, a regulatory tango. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(15), 2479-2488. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0033-3>
- Kahlson, G., & Rosengren, E. (1968). New approaches to the physiology of histamine. *Physiological Reviews*, 48(1), 155-196.
- Kaiser, A. (2012). Translational control of eIF5A in various diseases. *Amino Acids*, 42(2-3), 679-684. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1042-8>
- Kakavas, S., & Tiligada, E. (2006). Time course of thyroxine on hypothalamic histamine in the rat. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 55 Suppl 1, S32-33. <https://doi.org/10.1007/s00011-005-0029-x>
- Kanerva, K., Lappalainen, J., Mäkitie, L. T., Virolainen, S., Kovanen, P. T., & Andersson, L. C. (2009). Expression of antizyme inhibitor 2 in mast cells and role of polyamines as selective regulators of serotonin secretion. *PloS One*, 4(8), e6858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006858>
- Kanerva, K., Mäkitie, L. T., Bäck, N., & Andersson, L. C. (2010). Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor 2 regulates intracellular vesicle trafficking. *Experimental Cell Research*, 316(11), 1896-1906. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.021>
- Kanerva, K., Mäkitie, L. T., Pelander, A., Heiskala, M., & Andersson, L. C. (2008). Human ornithine decarboxylase paralogue (ODCp) is an antizyme inhibitor but not an arginine decarboxylase. *The Biochemical Journal*, 409(1), 187-192. <https://doi.org/10.1042/BJ20071004>
- Karasuyama, H., & Yamanishi, Y. (2014). Basophils have emerged as a key player in immunity. *Current Opinion in Immunology*, 31, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.07.004>
- Kihara, H., & Snell, E. E. (1957). SPERMINE AND RELATED POLYAMINES AS GROWTH STIMULANTS FOR *Lactobacillus Casei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43(10), 867-871.
- Kim, S., Prout, M., Ramshaw, H., Lopez, A. F., LeGros, G., & Min, B. (2010). Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(3), 1143-1147. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902447>
- Kirshenbaum, A. S., Akin, C., Wu, Y., Rottem, M., Goff, J.P., Beaven, M.A., Rao, V.K., & Metcalfe, D. D. (2003). Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leukemia Research*, 27(8), 677-682. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(02\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(02)00343-0)
- Kirshenbaum, A. S., Petrik, A., Walsh, R., Kirby, T. L., Vepa, S., Wangsa, D., Ried, T., & Metcalfe, D. D. (2014). A ten-year retrospective analysis of the distribution, use and phenotypic characteristics of the LAD2 human mast cell line. *International Archives of Allergy and Immunology*, 164(4), 265-270. <https://doi.org/10.1159/000365729>
- Koepsell, H., Lips, K., & Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical Research*, 24(7), 1227-1251. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9254-z>

- Kooijman, E.E., King, K.E., Gangoda, M., & Gericke, A. (2009). Ionization properties of phosphatidylinositol polyphosphates in mixed model membranes. *Biochemistry*, 48, 9360-9371.
- Kooijman, E.E., Swim, L.A., Graber, Z.T., Tyurin, Y.Y., Bayırd, H., Kagan V.E., & Kagan, V.E. (2016). Magic angle spinning 31P-NMR spectroscopy reveals two essentially identical ionization states for cardiolipin phosphates in phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, doi: 10.1016/j.bbmem.2016.10.013.
- Kraft, J. B., Peters, E. J., Slager, S. L., Jenkins, G. D., Reinalda, M. S., McGrath, P. J., & Hamilton, S. P. (2007). Analysis of association between the serotonin transporter and antidepressant response in a large clinical sample. *Biological Psychiatry*, 61(6), 734-742. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.07.017>
- Krüger, A., Vowinkel, J., Mülleder, M., Grote, P., Capuano, F., Bluemlein, K., & Ralser, M. (2013). Tpo1-mediated spermine and spermidine export controls cell cycle delay and times antioxidant protein expression during the oxidative stress response. *EMBO Reports*, 14(12), 1113-1119. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.165>
- Kuramasu, A., Saito, H., Suzuki, S., Watanabe, T., & Ohtsu, H. (1998). Mast cell-/basophil-specific transcriptional regulation of human L-histidine decarboxylase gene by CpG methylation in the promoter region. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31607-31614.
- Kurian, L., Palanimurugan, R., Gödderz, D., & Dohmen, R. J. (2011). Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. *Nature*, 477(7365), 490-494. <https://doi.org/10.1038/nature10393>
- Kushnir-Sukhov, N. M., Brittain, E., Scott, L., & Metcalfe, D. D. (2008). Clinical correlates of blood serotonin levels in patients with mastocytosis. *European Journal of Clinical Investigation*, 38(12), 953-958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.02047.x>
- Kushnir-Sukhov, N. M., Brown, J. M., Wu, Y., Kirshenbaum, A., & Metcalfe, D. D. (2007). Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(2), 498-499. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.09.003>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Landau, G., Bercovich, Z., Park, M. H., & Kahana, C. (2010). The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 12474-12481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106419>
- Lete, M. G., Sot, J., Ahyayauch, H., Fernández-Rivero, N., Prado, A., Goñi, F. M., & Alonso, A. (2014). Histones and DNA compete for binding polyphosphoinositides in bilayers. *Biophysical Journal*, 106(5), 1092-1100. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.01.023>
- Lete, M. G., Sot, J., Gil, D., Valle, M., Medina, M., Goñi, F. M., & Alonso, A. (2015). Histones cause aggregation and fusion of lipid vesicles containing phosphatidylinositol-4-phosphate. *Biophysical Journal*, 108(4), 863-871. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.12.018>
- Lethbridge, N. L., & Chazot, P. L. (2010). Immunological identification of the mouse H4 histamine receptor on spinal cord motor neurons using a novel anti-mouse H4R antibody. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 59 Suppl 2, S197-198. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0127-2>
- Li, X., & Coffino, P. (1993a). Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 2377-2383.
- Li, X., & Coffino, P. (1993b). Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 2377-2383.
- Lightfoot, H. L., & Hall, J. (2014). Endogenous polyamine function--the RNA perspective. *Nucleic Acids Research*, 42(18), 11275-11290. <https://doi.org/10.1093/nar/gku837>
- López-Contreras, A. J., Ramos-Molina, B., Cremades, A., & Peñafiel, R. (2008). Antizyme inhibitor 2 (AZIN2/ODCp) stimulates polyamine uptake in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 20761-20769. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801024200>
- López-Contreras, A. J., Ramos-Molina, B., Cremades, A., & Peñafiel, R. (2010). Antizyme inhibitor 2: molecular, cellular and physiological aspects. *Amino Acids*, 38(2), 603-611. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0419-4>
- López-Contreras, A. J., López-García, C., Jiménez-Cervantes, C., Cremades, A., & Peñafiel, R. (2006). Mouse ornithine decarboxylase-like gene encodes an antizyme inhibitor devoid of ornithine and arginine decarboxylating activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30896-30906. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602840200>
- López-García, C., Ramos-Molina, B., Lambertos, A., López-Contreras, A. J., Cremades, A., & Peñafiel, R. (2013). Antizyme inhibitor 2 hypomorphic mice. New patterns of expression in pancreas and adrenal glands suggest a role in secretory processes. *PloS One*, 8(7), e69188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069188>

- Lozier, A. M., Rich, M. E., Grawe, A. P., Peck, A. S., Zhao, P., Chang, A. T. T., Bond, J. P., & Sholler, G. S. (2015). Targeting ornithine decarboxylase reverses the LIN28/Let-7 axis and inhibits glycolytic metabolism in neuroblastoma. *Oncotarget*, 6(1), 196-206. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2768>
- Lupyan, D., Mezei, M., Logothetis, D. E., & Osman, R. (2010). A molecular dynamics investigation of lipid bilayer perturbation by PIP2. *Biophysical Journal*, 98(2), 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.063>
- Malbec, O., Roget, K., Schiffer, C., Iannascoli, B., Dumas, A. R., Arock, M., & Daëron, M. (2007). Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), 6465-6475.
- Mandal, S., Mandal, A., & Park, M. H. (2015). Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. *The Biochemical Journal*, 468(3), 435-447. <https://doi.org/10.1042/BJ20150168>
- Mangold, U. (2005). The antizyme family: polyamines and beyond. *IUBMB Life*, 57(10), 671-676. <https://doi.org/10.1080/15216540500307031>
- Mangold, U. (2006). Antizyme inhibitor: mysterious modulator of cell proliferation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(18), 2095-2101. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5583-4>
- Marton, L. J., & Pegg, A. E. (1995). Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 55-91. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.000415>
- Masini, E., Di Bello, M. G., Raspanti, S., Ndisang, J. F., Fomusi Ndisang, J., Baronti, R., Cappugi, P., & Mannaioni, P. F. (1998). The role of histamine in platelet aggregation by physiological and immunological stimuli. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 47(5), 211-220.
- Maślińska, D., Gujski, M., Laure-Kamionowska, M., Szukiewicz, D., & Wojtecka-Lukasik, E. (2004). Subcellular localization of histamine in articular cartilage chondrocytes of rheumatoid arthritis patients. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 53 Suppl 1, S35-36. <https://doi.org/10.1007/s00011-003-0316-3>
- Matés, J. M., Sánchez-Jiménez, F., López-Herrera, J., & Núñez de Castro, I. (1991). Regulation by 1,4-diamines of the ornithine decarboxylase activity induced by ornithine in perfused tumor cells. *Biochemical Pharmacology*, 42(5), 1045-1052.
- Mayer, L. D., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 858(1), 161-168.
- McKinney, J., Knappskog, P. M., & Haavik, J. (2005). Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *Journal of Neurochemistry*, 92(2), 311-320. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02850.x>
- McLaren, C. E., Fujikawa-Brooks, S., Chen, W.-P., Gillen, D. L., Pelot, D., Gerner, E. W., & Meyskens, F. L. (2008). Longitudinal assessment of air conduction audiograms in a phase III clinical trial of difluoromethylornithine and sulindac for prevention of sporadic colorectal adenomas. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 1(7), 514-521. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0074>
- Meers, P., Hong, K., Bentz, J., & Papahadjopoulos, D. (1986). Spermine as a modulator of membrane fusion: interactions with acidic phospholipids. *Biochemistry*, 25(11), 3109-3118.
- Meierhenrich, U. J., Muñoz Caro, G. M., Bredehöft, J. H., Jessberger, E. K., & Thiemann, W. H.-P. (2004). Identification of diamino acids in the Murchison meteorite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9182-9186. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403043101>
- Meininger, C. J. (1995). Mast cells and tumor-associated angiogenesis. *Chemical Immunology*, 62, 239-257.
- Metcalfe, D. D. (1984). Mast cell mediators with emphasis on intestinal mast cells. *Annals of Allergy*, 53(6 Pt 2), 563-575.
- Metcalfe, D. D. (2008). Mast cells and mastocytosis. *Blood*, 112(4), 946-956. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-078097>
- Meuer, S., Ecker, U., Hadding, U., & Bitter-Suermann, D. (1981). Platelet-serotonin release by C3a and C5a: two independent pathways of activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 126(4), 1506-1509.
- Meurer, S. K., Neß, M., Weiskirchen, S., Kim, P., Tag, C. G., Kauffmann, M., Huber, M., & Weiskirchen, R. (2016). Isolation of Mature (Peritoneum-Derived) Mast Cells and Immature (Bone Marrow-Derived) Mast Cell Precursors from Mice. *PloS One*, 11(6), e0158104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158104>

- Micelli, S., Gallucci, E., & Picciarelli, V. (2000). Studies of mitochondrial porin incorporation parameters and voltage-gated mechanism with different black lipid membranes. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 52(1), 63-75.
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3389-3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
- Minchin, R. F., & Martin, R. L. (1997). Extracellular calcium stimulates Na(+)-dependent putrescine uptake in B16 melanoma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(3), 447-454.
- Mitchell, J. L., Judd, G. G., Leyser, A., & Choe, C. (1998). Osmotic stress induces variation in cellular levels of ornithine decarboxylase-antizyme. *The Biochemical Journal*, 329 (Pt 3), 453-459.
- Modena, B. D., Dazy, K., & White, A. A. (2016). Emerging concepts: mast cell involvement in allergic diseases. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 174, 98-121. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.02.011>
- Moon, T. C., Befus, A. D., & Kulka, M. (2014). Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in Immunology*, 5, 569. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00569>
- Morgan, D. M. (1998). Polyamines. An introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 79, 3-30.
- Mössner, R., & Lesch, K. P. (1998). Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain, Behavior, and Immunity*, 12(4), 249-271. <https://doi.org/10.1006/brbi.1998.0532>
- Moya-Garcia, A. A., Medina, M. A., & Sánchez-Jiménez, F. (2005). Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 27(1), 57-63. <https://doi.org/10.1002/bies.20174>
- Mueller, P. S. (1962). Plasma free fatty acid response to insulin in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 7, 140-146.
- Murai, N., Shimizu, A., Murakami, Y., & Matsufuji, S. (2009). Subcellular localization and phosphorylation of antizyme 2. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(4), 1012-1021. <https://doi.org/10.1002/jcb.22334>
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., & Ichihara, A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*, 360(6404), 597-599. <https://doi.org/10.1038/360597a0>
- Murakami, Y., Suzuki, J., Samejima, K., & Oka, T. (2010). Developmental alterations in expression and subcellular localization of antizyme and antizyme inhibitor and their functional importance in the murine mammary gland. *Amino Acids*, 38(2), 591-601. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0422-9>
- Murakami, Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Omura, S., & Hayashi, S. (1996). Proteasome pathway operates for the degradation of ornithine decarboxylase in intact cells. *The Biochemical Journal*, 317 (Pt 1), 77-80.
- Nakagawa, S., Okaya, Y., Yatsunami, K., Tanaka, S., Ohtsu, H., Fukui, T., Watanabe, T., & Ichikawa, A. (1997). Identification of multiple regulatory elements of human L-histidine decarboxylase gene. *Journal of Biochemistry*, 121(5), 935-940.
- Nam, G., Jeong, S. K., Park, B. M., Lee, S. H., Kim, H. J., Hong, S. P., Kim, B., & Kim, B.-W. (2016). Selective Cannabinoid Receptor-1 Agonists Regulate Mast Cell Activation in an Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis Model. *Annals of Dermatology*, 28(1), 22-29. <https://doi.org/10.5021/ad.2016.28.1.22>
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin receptors. *Chemical Reviews*, 108(5), 1614-1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>
- Nilsson, J. A., Maclean, K. H., Keller, U. B., Pendeville, H., Baudino, T. A., & Cleveland, J. L. (2004). Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 24(4), 1560-1569.
- Norrbby, K. (1995). Evidence of a dual role of endogenous histamine in angiogenesis. *International Journal of Experimental Pathology*, 76(2), 87-92.
- Norris, V., Reusch, R. N., Igarashi, K., & Root-Bernstein, R. (2014). Molecular complementarity between simple, universal molecules and ions limited phenotype space in the precursors of cells. *Biology Direct*, 10, 28. <https://doi.org/10.1186/s13062-014-0028-3>
- Odenlund, M., Holmqvist, B., Baldetorp, B., Hellstrand, P., & Nilsson, B.-O. (2009). Polyamine synthesis inhibition induces S phase cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells. *Amino Acids*, 36(2), 273-282. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0060-7>
- Oh, C. K., Filler, S. G., & Cho, S. H. (2001). Eukaryotic translation initiation factor-6 enhances histamine and IL-2 production in mast cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(5), 3606-3611.

- Ohki, S., (2012). *Cell and Model Membrane Interactions*. Springer Editorial.
- Ohmori, E., Fukui, T., Imanishi, N., Yatsunami, K., & Ichikawa, A. (1990). Purification and characterization of l-histidine decarboxylase from mouse mastocytoma P-815 cells. *Journal of Biochemistry*, 107(6), 834-839.
- Ohtsu, H. (2010). Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 709, 21-31.
- Ohtsu, H., Kuramasu, A., Suzuki, S., Igarashi, K., Ohuchi, Y., Sato, M., Tanaka, S., Nakagawa, S., Shirato, K., Yamamoto, M., Ichikawa, A., & Watanabe, T. (1996). Histidine decarboxylase expression in mouse mast cell line P815 is induced by mouse peritoneal cavity incubation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28439-28444.
- Okada, K., Hidese, R., Fukuda, W., Niitsu, M., Takao, K., Horai, Y., Umezawa, N., Higuchi, T., Oshima, T., Yoshikawa, Y., Imanaka, T., & Fujiwara, S. (2014). Identification of a novel aminopropyltransferase involved in the synthesis of branched-chain polyamines in hyperthermophiles. *Journal of Bacteriology*, 196(10), 1866-1876. <https://doi.org/10.1128/JB.01515-14>
- Olofsson, G., & Sparr, E. (2013). Ionization constants pKa of cardiolipin. *PLoS One*, 8(9), e73040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073040>
- Orberg, M.-L., Schillén, K., & Nylander, T. (2007). Dynamic light scattering and fluorescence study of the interaction between double-stranded DNA and poly(amido amine) dendrimers. *Biomacromolecules*, 8(5), 1557-1563. <https://doi.org/10.1021/bm061194z>
- Otsuka, A., Nonomura, Y., & Kabashima, K. (2016). Roles of basophils and mast cells in cutaneous inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 38(5), 563-570. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0570-4>
- Overton, E. (1895). Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzelle. *Vierteljahrsschr Naturforsch Ges Zürich* 40, 159-201.
- Panagiotidis, C. A., Artandi, S., Calame, K., & Silverstein, S. J. (1995). Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 23(10), 1800-1809.
- Papaliadis, D., Boucher, W., Kempuraj, D., Michaelian, M., Wolfberg, A., House, M., & Theoharides, T. C. (2008). Niacin-induced «flush» involves release of prostaglandin D2 from mast cells and serotonin from platelets: evidence from human cells in vitro and an animal model. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(3), 665-672. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.141333>
- Park, M. H., Nishimura, K., Zanelli, C. F., & Valentini, S. R. (2010). Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids*, 38(2), 491-500. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0408-7>
- Parmentier, R., Ohtsu, H., Djebbara-Hannas, Z., Valatx, J.-L., Watanabe, T., & Lin, J.-S. (2002). Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(17), 7695-7711.
- Parsons, M. E., & Ganellin, C. R. (2006). Histamine and its receptors. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1, S127-135. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706440>
- Pegg, A. E. (2006). Regulation of ornithine decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(21), 14529-14532. <https://doi.org/10.1074/jbc.R500031200>
- Pegg, A. E. (2008). Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 294(6), E995-1010. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90217.2008>
- Pegg, A. E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 61(9), 880-894. <https://doi.org/10.1002/iub.230>
- Pegg, A. E. (2013). Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chemical Research in Toxicology*, 26(12), 1782-1800. <https://doi.org/10.1021/tx400316s>
- Pegg, A. E., Seely, J. E., Pösö, H., della Ragione, F., & Zagon, I. A. (1982). Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues. *Federation Proceedings*, 41(14), 3065-3072.
- Pegg, E. C., Walker, G. S., Scotchford, C. A., Farrar, D., & Grant, D. (2009). Mono-functional aminosilanes as primers for peptide functionalization. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 90(4), 947-958. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32155>
- Pitkänen, L. T., Heiskala, M., & Andersson, L. C. (2001). Expression of a novel human ornithine decarboxylase-like protein in the central nervous system and testes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(5), 1051-1057. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5703>
- Poulin, R., Casero, R. A., & Soulet, D. (2012). Recent advances in the molecular biology of metazoan polyamine transport. *Amino Acids*, 42(2-3), 711-723. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0987-y>
- Poulin, R., Lessard, M., & Zhao, C. (1995). Inorganic cation dependence of putrescine and spermidine transport in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(4), 1695-1704.

- Poulin, R., Pelletier, G., & Pegg, A. E. (1995). Induction of apoptosis by excessive polyamine accumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells. *The Biochemical Journal*, 311 (Pt 3), 723-727.
- Poulin, R., Zhao, C., Verma, S., Charest-Gaudreault, R., & Audette, M. (1998). Dependence of mammalian putrescine and spermidine transport on plasma-membrane potential: identification of an amiloride binding site on the putrescine carrier. *The Biochemical Journal*, 330 (Pt 3), 1283-1291.
- Powner, M. W., Gerland, B., & Sutherland, J. D. (2009a). Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature*, 459(7244), 239-242. <https://doi.org/10.1038/nature08013>
- Powner, M. W., Gerland, B., & Sutherland, J. D. (2009b). Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature*, 459(7244), 239-242. <https://doi.org/10.1038/nature08013>
- Prinz, C., Zanner, R., & Gratzl, M. (2003). Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. *Annual Review of Physiology*, 65, 371-382. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142205>
- Puri, N., & Roche, P. A. (2008). Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2580-2585. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707854105>
- Qin, C., Samudio, I., Ngwenya, S., & Safe, S. (2004). Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways. *Molecular Carcinogenesis*, 40(3), 160-170. <https://doi.org/10.1002/mc.20030>
- Ramakrishna, A., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2011). Phyto serotonin: a review. *Plant Signaling & Behavior*, 6(6), 800-809.
- Ramos-Molina, B., López-Contreras, A. J., Lambertos, A., Dardonville, C., Cremades, A., & Peñafiel, R. (2015). Influence of ornithine decarboxylase antizymes and antizyme inhibitors on agmatine uptake by mammalian cells. *Amino Acids*, 47(5), 1025-1034. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1931-3>
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948). Crystalline Serotonin. *Science (New York, N.Y.)*, 108(2804), 329-330. <https://doi.org/10.1126/science.108.2804.329>
- Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7), 267-271.
- Reed, G. E., Kirchner, J. E., & Carr, L. G. (1995). NF-Y activates mouse tryptophan hydroxylase transcription. *Brain Research*, 682(1-2), 1-12.
- Rendón, A., Carton, D. G., Sot, J., García-Pacios, M., Montes, L.-R., Valle, M., Arrondo, J. L., Goñi, F. M., & Ruiz-Mirazo, K. (2012). Model systems of precursor cellular membranes: long-chain alcohols stabilize spontaneously formed oleic acid vesicles. *Biophysical Journal*, 102(2), 278-286. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.026>
- Ribatti, D. (2016). Mast cells in lymphomas. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 101, 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.016>
- Rider, J. E., Hacker, A., Mackintosh, C. A., Pegg, A. E., Woster, P. M., & Casero, R. A. (2007). Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids*, 33(2), 231-240. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0513-4>
- Riley, J. F., & West, G. B. (1952). Histamine in tissue mast cells. *The Journal of Physiology*, 117(4), 72P-73P.
- Ringvall, M., Rönnerberg, E., Wernersson, S., Duelli, A., Henningsson, F., Abrink, M., García-Faroldi, G., Fajardo, I., & Pejler, G. (2008). Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4), 1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.11.031>
- Rioux-Leclercq, N., Delcros, J.-G., Bansard, J.-Y., Epstein, J. I., Patard, J.-J., Lobel, B., Guillé, F., Jouan, F., Bellaud, P., & Moulinoux, J.-P. (2004). Immunohistochemical analysis of tumor polyamines discriminates high-risk patients undergoing nephrectomy for renal cell carcinoma. *Human Pathology*, 35(10), 1279-1284.
- Rodríguez-Caso, C., Montañez, R., Cascante, M., Sánchez-Jiménez, F., & Medina, M. A. (2006). Mathematical modeling of polyamine metabolism in mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 21799-21812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602756200>
- Rodríguez-Caso, C., Rodríguez-Agudo, D., Moya-García, A. A., Fajardo, I., Medina, M. A., Subramaniam, V., & Sánchez-Jiménez, F. (2003). Local changes in the catalytic site of mammalian histidine decarboxylase can affect its global conformation and stability. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 270(21), 4376-4387.
- Ruiz-Chica, J., Medina, M. A., Sánchez-Jiménez, F., & Ramírez, F. J. (2001). Fourier transform Raman study of the structural specificities on the interaction between DNA and biogenic polyamines.

- Biophysical Journal*, 80(1), 443-454. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76027-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76027-4)
- Ruiz-Chica, J., Medina, M. A., Sánchez-Jiménez, F., & Ramírez, F. J. (2003). Raman spectroscopy study of the interaction between biogenic polyamines and an alternating AT oligodeoxyribonucleotide. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1628(1), 11-21.
- Ruiz-Mirazo, K., Briones, C., & de la Escosura, A. (2014). Prebiotic systems chemistry: new perspectives for the origins of life. *Chemical Reviews*, 114(1), 285-366. <https://doi.org/10.1021/cr2004844>
- Ruiz-Pérez, M. V., Medina, M. Á., Urdiales, J. L., Keinänen, T. A., & Sánchez-Jiménez, F. (2015). Polyamine metabolism is sensitive to glycolysis inhibition in human neuroblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6106-6119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619197>
- Russell, D. H. (1971). Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature: New Biology*, 233(39), 144-145.
- Sagor, G. H. M., Berberich, T., Takahashi, Y., Niitsu, M., & Kusano, T. (2013). The polyamine spermine protects Arabidopsis from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Research*, 22(3), 595-605. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9666-3>
- Sánchez-Jiménez, F., Montañez, R., Correa-Fiz, F., Chaves, P., Rodríguez-Caso, C., Urdiales, J. L., Aldana, J. F., & Medina, M. A. (2007). The usefulness of post-genomics tools for characterization of the amine cross-talk in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 2), 381-385. <https://doi.org/10.1042/BST0350381>
- Sánchez-Jiménez, F., Ruiz-Pérez, M. V., Urdiales, J. L., & Medina, M. A. (2013). Pharmacological potential of biogenic amine-polyamine interactions beyond neurotransmission. *British Journal of Pharmacology*, 170(1), 4-16. <https://doi.org/10.1111/bph.12109>
- Sanders, T. H., McMichael, R. W., & Hendrix, K. W. (2000). Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1243-1246.
- Sarhan, S., & Seiler, N. (1989). On the subcellular localization of the polyamines. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 370(12), 1279-1284.
- Saulnier Sholler, G. L., Gerner, E. W., Bergendahl, G., MacArthur, R. B., VanderWerff, A., Ashikaga, T., Ferguson, W., Roberts, W., Wada, R. K., Eslin, D., Kravaka, J. M., Kaplan, J., Mitchell, D., Parikh, N. S., Neville, K., Sender, L., Higgins, T., Kawakita, M., Hiramatsu, K., Moriya, S. S., & Bachmann, A. S. (2015). A Phase I Trial of DFMO Targeting Polyamine Addiction in Patients with Relapsed/Refractory Neuroblastoma. *PloS One*, 10(5), e0127246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127246>
- Sava, I. G., Battaglia, V., Rossi, C. A., Salvi, M., & Toninello, A. (2006). Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(8), 1272-1281. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.008>
- Schlicker, E., Betz, R., & Göthert, M. (1988). Histamine H3 receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 337(5), 588-590.
- Schuber, F. (1989). Influence of polyamines on membrane functions. *The Biochemical Journal*, 260(1), 1-10.
- Schuber, F., Hong, K., Düzgünes, N., & Papahadjopoulos, D. (1983). Polyamines as modulators of membrane fusion: aggregation and fusion of liposomes. *Biochemistry*, 22(26), 6134-6140.
- Seiler, N. (2003). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Current Drug Targets*, 4(7), 537-564.
- Seiler, N., Delcros, J. G., & Moulinoux, J. P. (1996). Polyamine transport in mammalian cells. An update. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(8), 843-861.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 286. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
- Shantz, L. M., & Pegg, A. E. (1999). Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(1), 107-122.
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G. W., Kobayashi, T., Stevens, R. C., & Iwata, S. (2011). Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*, 475(7354), 65-70. <https://doi.org/10.1038/nature10236>
- Siemann, L., & Creasy, L. (1992). Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American Journal of Enology Viticulture*, 43, 49-52.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023), 720-731.
- Siracusa, M. C., Comeau, M. R., & Artis, D. (2011). New insights into basophil biology: initiators, regulators, and effectors of type 2 inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217, 166-177. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05918.x>

- Siracusa, M. C., Kim, B. S., Spergel, J. M., & Artis, D. (2013). Basophils and allergic inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(4), 789-801; quiz 788. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.046>
- Smith, M. A., & Davies, P. J. (1985). Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiology*, 78(1), 89-91.
- Snapir, Z., Keren-Paz, A., Bercovich, Z., & Kahana, C. (2008). ODCp, a brain- and testis-specific ornithine decarboxylase paralogue, functions as an antizyme inhibitor, although less efficiently than AzI1. *The Biochemical Journal*, 410(3), 613-619. <https://doi.org/10.1042/BJ20071423>
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133-159. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
- Sommer, C. (2004). Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Molecular Neurobiology*, 30(2), 117-125. <https://doi.org/10.1385/MN:30:2:117>
- Soulet, D., Gagnon, B., Rivest, S., Audette, M., & Poulin, R. (2004). A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49355-49366. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401287200>
- Spinas, E., Kritas, S. K., Saggini, A., Mobili, A., Caraffa, A., Antinolfi, P., Pantalone, A., Tei, M., Speziali, A., Saggini, R., & Conti, P. (2014). Role of mast cells in atherosclerosis: a classical inflammatory disease. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27(4), 517-521.
- St John, A. L. (2013). Influence of mast cells on dengue protective immunity and immune pathology. *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003783. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003783>
- Sullivan, B. M., Liang, H.-E., Bando, J. K., Wu, D., Cheng, L. E., McKerrow, J. K., Allen, C. D., & Locksley, R. M. (2011). Genetic analysis of basophil function in vivo. *Nature Immunology*, 12(6), 527-535. <https://doi.org/10.1038/ni.2036>
- Suzuki, S., Tanaka, S., Nemoto, K., & Ichikawa, A. (1998). Membrane targeting and binding of the 74-kDa form of mouse L-histidine decarboxylase via its carboxyl-terminal sequence. *FEBS Letters*, 437(1-2), 44-48.
- Tabib, A., & Bachrach, U. (1998a). Polyamines induce malignant transformation in cultured NIH 3T3 fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(1), 135-146.
- Tabib, A., & Bachrach, U. (1998b). Polyamines induce malignant transformation in cultured NIH 3T3 fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(1), 135-146.
- Tadolini, B., & Varani, E. (1986). Interaction of spermine with polyphosphoinositides containing liposomes and myo-inositol 1,4,5 triphosphate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135(1), 58-64.
- Tanaka, S., Deai, K., Konomi, A., Takahashi, K., Yamane, H., Sugimoto, Y., & Ichikawa, A. (2004). Expression of L-histidine decarboxylase in granules of elicited mouse polymorphonuclear leukocytes. *European Journal of Immunology*, 34(5), 1472-1482. <https://doi.org/10.1002/eji.200324636>
- Tanaka, S., Nemoto, K., Yamamura, E., & Ichikawa, A. (1998). Intracellular localization of the 74- and 53-kDa forms of L-histidine decarboxylase in a rat basophilic/mast cell line, RBL-2H3. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(14), 8177-8182.
- Tanaka, Y., Yamaguchi, M., Suzukawa, M., Arai, H., Nagase, H., & Ohta, K. (2015). Modulation of human basophil activation by resveratrol. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 64 Suppl, S80-82. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.05.003>
- Teigen, K., McKinney, J. A., Haavik, J., & Martínez, A. (2007). Selectivity and affinity determinants for ligand binding to the aromatic amino acid hydroxylases. *Current Medicinal Chemistry*, 14(4), 455-467.
- Thomas, T., Gallo, M. A., Klinge, C. M., & Thomas, T. J. (1995). Polyamine-mediated conformational perturbations in DNA alter the binding of estrogen receptor to poly(dG-m5dC).poly(dG-m5dC) and a plasmid containing the estrogen response element. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 54(3-4), 89-99.
- Thurmond, R. L., Gelfand, E. W., & Dunford, P. J. (2008). The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(1), 41-53. <https://doi.org/10.1038/nrd2465>
- Tian, Y., Wang, S., Wang, B., Zhang, J., Jiang, R., & Zhang, W. (2012). Overexpression of SSAT by DENSEPM treatment induces cell detachment and apoptosis in glioblastoma. *Oncology Reports*, 27(4), 1227-1232. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1592>
- Tiligada, E. (2012). Editorial: is histamine the missing link in chronic inflammation? *Journal of Leukocyte Biology*, 92(1), 4-6. <https://doi.org/10.1189/jlb.0212093>
- Tiligada, E., Kyriakidis, K., Chazot, P. L., & Passani, M. B. (2011). Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17(6), 620-628. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00212.x>

- Torossian, K., Audette, M., & Poulin, R. (1996). Substrate protection against inactivation of the mammalian polyamine-transport system by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodi-imide. *The Biochemical Journal*, 319 (Pt 1), 21-26.
- Tschopp, C. M., Spiegel, N., Didichenko, S., Lutmann, W., Julius, P., Virchow, J. C., Hack, C. E., & Dahinden, C. A. (2006). Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood*, 108(7), 2290-2299. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-010348>
- Tsolakis, A. V., Grimelius, L., Granerus, G., Stridsberg, M., Falkmer, S. E., & Janson, E. T. (2015). Histidine decarboxylase and urinary methylimidazoleacetic acid in gastric neuroendocrine cells and tumours. *World Journal of Gastroenterology*, 21(47), 13240-13249. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i47.13240>
- Turlejski, K. (1996). Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 56(2), 619-636.
- Uemura, T., Stringer, D. E., Blohm-Mangone, K. A., & Gerner, E. W. (2010). Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), G517-522. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00169.2010>
- Uimari, A., Keinänen, T. A., Karppinen, A., Woster, P., Uimari, P., Jänne, J., & Alhonen, L. (2009). Spermine analogue-regulated expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase and its effects on depletion of intracellular polyamine pools in mouse fetal fibroblasts. *The Biochemical Journal*, 422(1), 101-109. <https://doi.org/10.1042/BJ20090411>
- Ulrich, S., Loitsch, S. M., Rau, O., von Knechten, A., Brüne, B., Schubert-Zsilavecz, M., & Stein, J. M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. *Cancer Research*, 66(14), 7348-7354. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2777>
- Urdiales, J. L., Matés, J. M., Núñez de Castro, I., & Sánchez-Jiménez, F. M. (1992). Chlorpheniramine inhibits the ornithine decarboxylase induction of Ehrlich carcinoma growing in vivo. *FEBS Letters*, 305(3), 260-264.
- Urdiales, J. L., Medina MA, & Sánchez-Jiménez, F. (2001). Polyamine metabolism revisited. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13(9), 1015-1019.
- van Paridon, P.A., de Kuijff, B., Ouwerkerk, R., & K Wirtz, K.W. (1986). Phosphoinositides undergo charge neutralization in the physiological pH range: a ³¹P-NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 877, 216-219.
- Viguera, A. R., Alonso A., & Goñi, F. M. (1995). Liposome aggregation induced by poly (ethylene glycol). Rapid kinetic studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3, 263-270.
- Vijayanathan, V., Thomas, T. J., Nair, S. K., Shirahata, A., Gallo, M. A., & Thomas, T. (2006). Bending of the estrogen response element by polyamines and estrogen receptors alpha and beta: a fluorescence resonance energy transfer study. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(7), 1191-1206.
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2(7), 489-501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>
- Vivó, M., de Vera, N., Cortés, R., Mengod, G., Camón, L., & Martínez, E. (2001). Polyamines in the basal ganglia of human brain. Influence of aging and degenerative movement disorders. *Neuroscience Letters*, 304(1-2), 107-111.
- Voehringer, D. (2013). Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nature Reviews. Immunology*, 13(5), 362-375. <https://doi.org/10.1038/nri3427>
- Vujcic, S., Diegelman, P., Bacchi, C. J., Kramer, D. L., & Porter, C. W. (2002). Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *The Biochemical Journal*, 367(Pt 3), 665-675. <https://doi.org/10.1042/BJ20020720>
- Vujcic, S., Halmekyto, M., Diegelman, P., Gan, G., Kramer, D. L., Janne, J., & Porter, C. W. (2000). Effects of conditional overexpression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase on polyamine pool dynamics, cell growth, and sensitivity to polyamine analogs. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38319-38328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003270200>
- Vujcic, S., Liang, P., Diegelman, P., Kramer, D. L., & Porter, C. W. (2003). Genomic identification and biochemical characterization of the mammalian polyamine oxidase involved in polyamine back-conversion. *The Biochemical Journal*, 370(Pt 1), 19-28. <https://doi.org/10.1042/BJ20021779>
- Walter, M., & Stark, H. (2012). Histamine receptor subtypes: a century of rational drug design. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 4, 461-488.
- Walther, D. J., & Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*, 66(9), 1673-1680.
- Walther, D. J., Peter, J. U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., & Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science (New York, N.Y.)*,

- 299(5603), 76. <https://doi.org/10.1126/science.1078197>
- Wang, C.H., & Huang, Y. Y. (2003). Encapsulating protein into preformed liposomes by ethanol-destabilized method. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, 31(3), 303-312.
- Wang, H., Liu, B., Li, H., & Zhang, S. (2016). Identification and biochemical characterization of polyamine oxidases in amphioxus: Implications for emergence of vertebrate-specific spermine and acetyl polyamine oxidases. *Gene*, 575(2 Pt 2), 429-437. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.017>
- Wang, L., Erlandsen, H., Haavik, J., Knappskog, P. M., & Stevens, R. C. (2002). Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin. *Biochemistry*, 41(42), 12569-12574.
- Wang, Y., Devereux, W., Stewart, T. M., & Casero, R. A. (1999). Cloning and characterization of human polyamine-modulated factor-1, a transcriptional cofactor that regulates the transcription of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 22095-22101.
- Wang, Y.H., Bucki, R., & Janmey, P.A. (2016). Cholesterol-dependent phase-demixing in lipid bilayers as a switch for the activity of the phosphoinositide-binding cytoskeletal protein gelsolin. *Biochemistry* 55, 3361-3369.
- Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews. Immunology*, 14(7), 478-494. <https://doi.org/10.1038/nri3690>
- Wolter, F., Turchanowa, L., & Stein, J. (2003). resveratrol-induced modification of polyamine metabolism is accompanied by induction of c-Fos. *Carcinogenesis*, 24(3), 469-474.
- Wood, P. L., Khan, M. A., & Moskal, J. R. (2007). The concept of «aldehyde load» in neurodegenerative mechanisms: cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. *Brain Research*, 1145, 150-156. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.004>
- Xie, Q. W., Tabor, C. W., & Tabor, H. (1993). Deletion mutations in the speED operon: spermidine is not essential for the growth of Escherichia coli. *Gene*, 126(1), 115-117.
- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T., Michael, A., & Kusano, T. (2006). The polyamine spermine protects against high salt stress in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*, 580(30), 6783-6788. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.078>
- Yildirim, B. O., & Derksen, J. J. L. (2013). Systematic review, structural analysis, and new theoretical perspectives on the role of serotonin and associated genes in the etiology of psychopathy and sociopathy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(7), 1254-1296. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.009>
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Kawai, G., Ishihama, A., & Igarashi, K. (2002). Polyamines enhance synthesis of the RNA polymerase sigma 38 subunit by suppression of an amber termination codon in the open reading frame. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37139-37146. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206668200>
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., Ishihama, A., & Igarashi, K. (2004). A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46008-46013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404393200>
- Zampeli, E., & Tiligada, E. (2009). The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *British Journal of Pharmacology*, 157(1), 24-33. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00151.x>
- Zhang, X., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5681), 217. <https://doi.org/10.1126/science.1097540>
- Zhang, X.C., Strassman, A. M., Burstein, R., & Levy, D. (2007). Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(2), 806-812. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.123745>
- Zhao, B., & Butler, A. P. (2001). Core promoter involvement in the induction of rat ornithine decarboxylase by phorbol esters. *Molecular Carcinogenesis*, 32(2), 92-99.
- Zhendre, V., Grélard, A., Garnier-Lhomme, M., Buchoux, S., Larijani, B., & Dufourc, E. J. (2011). Key role of polyphosphoinositides in dynamics of fusogenic nuclear membrane vesicles. *PloS One*, 6(9), e23859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023859>
- Zhu, M. Y., Iyo, A., Piletz, J. E., & Regunathan, S. (2004). Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1670(2), 156-164.
- Zill, P., Baghai, T. C., Zwanzger, P., Schüle, C., Eser, D., Rupprecht, R., Möller, H. J., Bondy, B., & Ackenheil, M. (2004). SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform

- (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Molecular Psychiatry*, 9(11), 1030-1036. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001525>
- Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A.D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Röhl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J., Toudjarska, I., Wheat, A.J., Yaworski, E., Zedalis, W., Koteliensky, V., Manoharan, M., Vornlocher, H.P., & MacLachlan, I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441(7089), 111-114. <https://doi.org/10.1038/nature04688>
- Zwadlo-Klarwasser, G., Braam, U., Mühl-Zürbes, P., & Schmutzler, W. (1994). Macrophages and lymphocytes: alternative sources of histamine. *Agents and Actions*, 41 Spec No, C99-100.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXOS

ANEXO I: Capítulo de Libro, *Evaluation of Histidine decarboxylase activity and Human Histamine Receptor 3 (H3R) and Histidine Decarboxylase (HDC) mRNA Levels*, publicado en "Histamine Receptors as Drug Targets". Springer (2017). ISBN: 978-1-4939-6841-1. Autores: Carlos Acosta-Andrade, José L. Urdiales, Ignacio Fajardo, Francisca Sánchez-Jiménez.

DOI: 10.1007/978-1-4939-6843-5_13

https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6843-5_13

ANEXO II: Artículo científico, *A novel role for antizyme inhibitor 2 as a regulator of serotonin and histamine biosynthesis and content in mouse mast cells*, publicado en *Amino Acids* (2016) 48: 2411-2421. Autores: Carlos Acosta-Andrade, Ana Lambertos, José Luis Urdiales, Francisca Sánchez-Jiménez, Rafael Peñafiel, Ignacio Fajardo.

PMID: 27084713

DOI: 10.1007/s00726-016-2230-3

ANEXO III: Artículo científico, *Polyamine-RNA-membrane interactions: from the past to the future of biology*, publicado en *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2017) 155: 173–181. Autores: Carlos Acosta-Andrade, Ibai Artetxe, Marta G. Lete, Kepa Ruiz-Mirazo, Felix Goñi, Francisca Sánchez-Jiménez.

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.005